

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO**

CAROLINY MESQUITA ARAÚJO

**EFEITO PROTETOR DE COPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE  
FRUTAS TROPICAIS EM CEPAS PROBIÓTICAS *Lactobacillus* APÓS  
LIOFILIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO**

João Pessoa

2019

CAROLINY MESQUITA ARAÚJO

**EFEITO PROTETOR DE COPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE FRUTAS  
TROPICAIS EM CEPAS PROBIÓTICAS *Lactobacillus* APÓS LIOFILIZAÇÃO E  
ARMAZENAMENTO**

João Pessoa

2019

CAROLINY MESQUITA ARAÚJO

**EFEITO PROTETOR DE COPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE FRUTAS  
TROPICAIS EM CEPAS PROBIÓTICAS *Lactobacillus* APÓS LIOFILIZAÇÃO E  
ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição do Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Elieidy Gomes de Oliveira

João Pessoa

2019

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

A663e Araújo, Caroliny Mesquita.

Efeito protetor de coprodutos do processamento de frutas tropicais em cepas probióticas *Lactobacillus* após liofilização e armazenamento / Caroliny Mesquita Araújo. - João Pessoa, 2019.

86 f.

Orientação: MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Frutas. 2. Resíduos Agroindustriais. 3. Preservação. 4. Crioprotetores. 5. *Lactobacillus* spp. 6. Danos celulares. I. OLIVEIRA, MARIA ELIEIDY GOMES DE. II. Título.


UFPB/BC

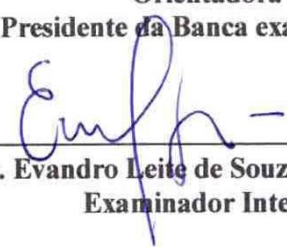
CAROLINY MESQUITA ARAÚJO

**EFEITO PROTETOR DE COPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE FRUTAS  
TROPICAIS EM CEPAS PROBIÓTICAS *Lactobacillus* APÓS LIOFILIZAÇÃO E  
ARMAZENAMENTO**

Dissertação \_\_\_\_\_ em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira – DN/CCS/UFPB**  
**Orientadora**  
**Presidente da Banca examinadora**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Evandro Leite de Souza – DN/CCS/UFPB**  
**Examinador Interno**

\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Estefânia Fernandes Garcia DG/CTDR/UFPB**  
**Examinadora Externa**

\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga – DN/CCS/UFPB**  
**Examinadora Suplente Interna**

\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Ingrid Conceição Dantas Guerra DG/CTDR/UFPB**  
**Examinadora Suplente Externa**

*Dedico este trabalho a Deus, que me deu força em todos os momentos, principalmente os difíceis. A minha orientadora, pois sem ela nada seria possível. Aos meus pais e meu irmão, que são essenciais em minha vida. Ao meu esposo, pelo amor e apoio em todos os momentos. E a todos que contribuíram de alguma forma nesta etapa tão importante da minha vida.*

***Dedico***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida. Agradeço por ter me dado forças nos momentos mais difíceis, onde minha fé só aumenta; pelas bênçãos sem fim, pelas alegrias, conquistas e por tudo, sem ti, Senhor, não sou nada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição/UFPB, em especial ao corpo docente, pela oportunidade e atenção no decorrer do curso de mestrado.

A minha professora, Maria Elieidy, pela sua paciência, apoio, amor e carinho em todos os momentos, pela mão amiga, pela sua cumplicidade e por ter acreditado no meu potencial. Obrigada por tudo.

Ao professor Dr. Evandro Leite de Souza, que abriu as portas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Alimentos para realização deste estudo, pela disponibilidade não só da estrutura física com seus equipamentos, mas também pelos materiais de consumo utilizados na pesquisa, por seus preciosos ensinamentos e pelas preciosas considerações para a melhoria do meu trabalho.

A professora Dra. Andrea Gómez-Zavaglia, pela idealização do tema do trabalho desenvolvido e pela disponibilidade e presteza em responder todas as minhas dúvidas, me direcionando quanto à execução de alguns ensaios.

A querida professora Dra. Maria Lúcia da Conceição, pelo carinho, acolhimento e todos os ensinamentos no laboratório.

A professora Dra. Estefânia Fernandes Garcia, pela sua disponibilidade para retirar dúvidas sempre que necessitei e também pelas suas valiosas considerações para a melhoria do meu trabalho.

Ao professor Dr. Marcos dos Santos Lima, do Instituto Federal do Sertão de Pernambuco em Petrolina-PE, pela condução das análises cromatográficas. A professora da UFCG/Cuité-PB, Dra. Vanessa Bordin Vieira, por todo apoio nas análises de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante dos coprodutos de frutas. À coordenadora do Laboratório de Bromatologia/UFPB, professora Dra. Rita de Cássia, por gentilmente ceder o espaço físico e insumos utilizados para realização das análises físico-químicas dos coprodutos.

Aos meus pais, Everson Rafael e Maria Ivaneide, por tudo que fizeram e fazem por mim, pelo apoio e força em todos os momentos alegres e difíceis, e por não me deixar desacreditar diante das dificuldades; pelos puxões de orelha nas horas certas, pelas orações, pelos sorrisos e todos os gestos de amor que vocês me transmitem, obrigada por tudo.

Ao meu irmão, Caio Vinícius, que sempre me ajudou e incentivou em todos os momentos a seguir os meus sonhos e nunca desistir.

A minha bisã, Ita, que é a minha dose de alegria diária, com seu carinho e amor transformador, obrigada por estar presente nos meus dias.

Ao meu esposo, Tony Lira, pelo amor, carinho e compreensão nas horas que lhe foram roubadas; pelos momentos de companheirismo, não me deixando desacreditar diante das dificuldades, seu apoio foi e é de fundamental importância na minha vida, você transmite a paz que preciso, o meu muitíssimo obrigada.

A minha querida amiga, Karoliny Sampaio, minha parceira nas análises no laboratório, por todo apoio, dedicação, amizade e companheirismo.

A minha companheira, Francisca Nayara, sempre disponível para retirar dúvidas sobre as análises e me auxiliar na execução do trabalho.

A minha amiga Thatyane Mariano, por ceder alguns materiais laboratoriais para execução das análises e disponibilidade em retirar minhas dúvidas.

A colega de laboratório, Érika Thayse, pela ajuda e orientação quanto a execução das análises de citometria de fluxo, a qual foi crucial para o meu trabalho.

As minhas amigas, Amanda Almeida, Carolina Moreira, Laiane Nascimento, Flaviany Teodoro, Morganna Moreira, por todo apoio e carinho em todos os momentos da minha caminhada. Vou levar vocês para sempre em meu coração. A todas, o meu muitíssimo obrigada.

Ao secretário da Pós-Graduação, Carlos Fernando, que sempre foi muito gentil em atender aos meus pedidos e responder as minhas dúvidas.

A nutricionista Lorena Oliveira e toda equipe da empresa Pé de Fruta, que gentilmente nos forneceu a matéria-prima essencial para esse trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, aqui ficam os meus sinceros agradecimentos.



## RESUMO

A produção de frutas representa um segmento de grande importância para a economia, uma vez que a maior parte dessa produção é destinada a indústria de processamento para a fabricação de diversos produtos, com isso, é gerada grandes quantidades de coprodutos agroindústrias, estes constituídos de cascas, sementes, bagaço, talos e outras partes da fruta que apresentam em sua composição açúcares simples e oligossacarídeos não digeríveis, como também compostos fenólicos. Acredita-se, que esses coprodutos possam atuar na proteção de bactérias ácido-láticas (BAL) como os *Lactobacillus*, durante processos de preservação aplicados na indústria, substituindo açúcares que geralmente são utilizados, agregando valor a estes coprodutos que são comumente descartados no meio ambiente. Este estudo avaliou o efeito protetor de coprodutos do processamento das frutas tropicais acerola (*Malpighia glabra* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.) e goiaba (*Psidium guajava* L.) sobre as cepas probióticas (*Lactobacillus paracasei* L-10, *L. casei* L-26 e *L. acidophilus* LA-05) após processo de liofilização e ao longo do armazenamento. Para isso, foram realizadas análises de avaliação da viabilidade das cepas de *Lactobacillus* antes e após o processo de liofilização na presença dos coprodutos de frutas testados. Além disso, foi avaliada a ocorrência de danos na integridade de membrana, potencial de membrana e atividade de efluxo das cepas de *Lactobacillus*, causados pelo processo de liofilização com cada coproduto de fruta, por meio de citometria de fluxo; bem como a análise da sobrevivência das cepas liofilizadas durante 90 dias de armazenamento sob temperatura de refrigeração e ambiente. O processo de liofilização causou diminuição das contagens de células viáveis de todas as cepas de *Lactobacillus* testadas, com maiores reduções para *L. casei* L-26 liofilizada na ausência dos coprodutos de frutas (redução aproximada de 2,9 log UFC/mL). Após 48 h da liofilização, o número de células viáveis foi maior para as cepas liofilizadas com os coprodutos de frutas (7,4 - 8,9 log UFC/mL) quando comparada as cepas liofilizadas sem substrato ou na presença de frutoligossacarídeo. A análise de citometria de fluxo comprovou o efeito protetor exercido pelos coprodutos de frutas testados sobre as cepas de *Lactobacillus*, as quais apresentaram menores subpopulações com danos, principalmente na integridade de membrana e atividade de efluxo. As cepas de *Lactobacillus* liofilizadas com os coprodutos mantiveram a viabilidade (aproximadamente 2,6 - 5,3 log UFC/mL) após 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente ou de refrigeração, com contagens superiores às cepas liofilizadas sem coprodutos (1 - 4 log UFC/mL). De forma geral, os maiores efeitos protetores foram observados para as cepas liofilizadas na presença do coproduto de acerola (~ 5 log UFC/mL). Os efeitos protetores exercidos pelos coprodutos de frutas testados sobre as cepas de *Lactobacillus* poderiam estar relacionados às elevadas quantidades de açúcares, fibras e compostos fenólicos presentes nestes materiais. Esses resultados mostram o potencial de uso dos coprodutos do processamento de acerola, caju e goiaba como substratos protetores para uso no processo de liofilização de cepas probióticas de *Lactobacillus*.

**Palavras-chave:** Frutas. Resíduos agroindustriais. Preservação. Crioprotetores. *Lactobacillus* spp. Danos celulares.

## ABSTRACT

The production of fruit represents a segment of great importance for the economy, since most of this production is destined to the processing industry for the manufacture of several products, with that, it generates large quantities of co-products agroindustries, these constituted of barks, seeds, bagasse, stalks and other parts of the fruit which contain in their composition simple sugars and non-digestible oligosaccharides, as well as phenolic compounds. It is believed that these co-products can act in the protection of lactic acid bacteria (LAB), such as *Lactobacillus*, during preservation processes applied in industry, replacing sugars that are generally used, adding value to these coproducts that are commonly discarded in the environment. This study evaluated the protective effect of co-products from the processing of tropical fruits (*Malpighia glabra* L.), cashew (*Anacardium occidentale* L.) and guava (*Psidium guayaba* L.) on probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* L-10, *L. casei* L-26 and *L. acidophilus* LA-05) after freeze-drying and storage. For this, analyzes of the viability of *Lactobacillus* strains were performed before and after the lyophilization process in the presence of the tested fruit co-products. In addition, the occurrence of damage to membrane integrity, membrane potential and efflux activity of *Lactobacillus* strains caused by the lyophilization process with each fruit co-product was evaluated by means of flow cytometry; as well as analysis of the survival of lyophilized strains during 90 days of storage under refrigeration and ambient temperature. The lyophilization process caused a decrease in viable cell counts of all *Lactobacillus* strains tested, with the greatest reductions for lyophilized *L. casei* L-26 in the absence of fruit co-products (approximate reduction of 2.9 log CFU / mL). After 48 h of lyophilization, the number of viable cells was higher for lyophilized strains with fruit co-products (7.4 - 8.9 log CFU / mL) when compared to lyophilized strains without substrate or in the presence of fructooligosaccharide. Flow cytometric analysis demonstrated the protective effect exerted by fruit co-products tested on *Lactobacillus* strains, which presented lower subpopulations with damage, mainly in membrane integrity and efflux activity. *Lactobacillus* strains lyophilized with co-products maintained viability (approximately 2.6-5.3 log CFU / mL) after 90 days storage at room temperature or refrigeration, with counts higher than lyophilized strains without co-products (1-4 log UFC / mL). In general, the greatest protective effects were observed for lyophilized strains in the presence of the acerola co-product (~ 5 log CFU / mL). The protective effects exerted by fruit co-products tested on *Lactobacillus* strains could be related to the high amounts of sugars, fibers and phenolic compounds present in these materials. These results show the potential of the coproducts of the processing of acerola, cashew and guava as protective substrates for use in the process of lyophilization of probiotic strains of *Lactobacillus*.

**Keywords:** Fruits. Agroindustrial waste. Preservation. Cryoprotectants. *Lactobacillus* spp. Cell damage.

## LISTA DE FIGURAS

### FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1: Fruto da aceroleira ( <i>Malphigia emarginata</i> D.C.).....	18
Figura 2: Fruto do cajueiro ( <i>Anacardium occidentale</i> L.).....	19
Figura 3: Fruto da goiabeira ( <i>Psidium guajava</i> L.).....	21
Figura 4: Diagrama de fases da água e os processos de separação do liofilizador.....	23
Figura 5: Delineamento experimental.....	25
Figura 6: Coprodutos <i>in natura</i> e liofilizados de acerola (A), caju (B) e goiaba (C), respectivamente.....	26

### FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1: Viability of the strains by the viable cell counting procedure, for <i>L. paracasei</i> L-10 (A), <i>L. casei</i> L-26 (B) e <i>L. acidophillus</i> LA-05 (B), in the treatments of CNE (●), CPO (■), ACE (□), CAJ (△) e GOI (○) after the lyophilization process, during 48 h of incubation at 37 °C.....	80
Figure 2: Fluorescence density plot of <i>L. paracasei</i> L-10 in response to staining with PI (A-E), EB (F-J) and DiBAC4 (3) (K-O) after dehydration (lyophilization) in different treatments.....	81
Figure 3: Fluorescence density plot of <i>L. casei</i> L-26 in response to staining with PI (A-E), EB (F-J) and DiBAC4 (3) (K-O) after dehydration (lyophilization) in different treatments.....	82
Figure 4: Fluorescence density plot of <i>L. acidophillus</i> LA-05 in response to staining with PI (A-E), EB (F-J) and DiBAC4 (3) (K-O) after dehydration (lyophilization) in different treatments.....	83
Figure 5: Viability of the <i>L. paracasei</i> strains L-10 (A-B), <i>L. casei</i> L-26 (C-D) and <i>L. acidophillus</i> LA-05 (E-F), after the preservation process (in log CFU/mL), stored at a temperature of 4 °C (left side) and 25 °C (right side), solution of the CNE (●), solution of the CPO (■), the solution of the ACE (□), the solution of the CAJ (△) and solution of the GOI (○) for 90 days.....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
AOAC	“Association of Official Agricultural Chemists”
BAL	Bactéria ácido láctica
BOX	Ácido bis-1,3-dibutylbarbutiric
BE	Brometo de etídio
°C	Graus Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMRS	Caldo de Mann, Rogosa e Sharpe
DO	Densidade Óptica
FAO	“Food and Agriculture Organization”
CF	Citometria de Fluxo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Equivalentes de catequina
FOS	Fruto-oligosacarídeos
FRAP	“Ferric Reducing antioxidant power”
GOS	Galacto-oligosacarídeos
HCl	Ácido clorídrico
IP	Iodeto de propídio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
RID	“Refractive Index Detector”
RPM	Rotação por minuto
UFC	Unidade de formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
2.1 PROCESSAMENTO DE FRUTAS E GERAÇÃO DE COPRODUTOS.....	16
2.1.1 Acerola ( <i>Malpighia emarginata</i> D.C.).....	17
2.1.2 Caju ( <i>Anacardium occidentale</i> L.).....	18
2.1.3 Goiaba ( <i>Psidium guajava</i> L.).....	20
2.2 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS: CONCEITO E PRESERVAÇÃO.....	21
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
3.2 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS COPRODUTOS DE FRUTAS.....	26
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COPRODUTOS DE FRUTAS LIOFILIZADOS.....	27
3.3.1 Análises físico-químicas.....	27
3.3.2 Determinação do perfil de compostos fenólicos e do teor de compostos fenólicos totais, flavonóides totais e atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	27
3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DOS COPRODUTOS LIOFILIZADOS SOB AS CEPAS DE <i>Lactobacillus</i> .....	31
3.4.1 Microrganismos, preparação do inóculo e tratamentos.....	31
3.4.2 Liofilização das cepas de <i>Lactobacillus</i> .....	32
3.4.3 Avaliação da viabilidade das cepas de <i>Lactobacillus</i> após a liofilização.....	32
3.4.4 Avaliação de danos nas células bacterianas após a liofilização.....	32
3.4.5 Avaliação da viabilidade das cepas teste durante estocagem.....	34
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	34
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>46</b>
<b>ARTIGO.....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de frutas está em constante crescimento, devido ao reconhecimento do valor nutricional e como fonte de compostos com propriedades bioativas relacionadas à promoção da saúde (GONZALEZ-AGUILAR et al., 2008; GONZALEZ-AGUILAR et al., 2010; RUFINO et al., 2010). O Brasil possui grande diversidade de frutas, sendo considerado o terceiro produtor mundial de frutas frescas e processadas (ALAMAR et al., 2016). Em relação às frutas tropicais, o país é classificado como maior produtor do mundo, incluindo frutas como acerola (*Malpighia glabra* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.) e goiaba (*Psidium guayaba* L.), as quais são amplamente difundidas e valorizadas por suas características nutricionais e sensoriais (ABREU et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2015; SILVA et al., 2014).

A maior parte da produção nacional de frutas é destinada para as indústrias de processamento, onde aproximadamente 47% do total de frutas produzidas são destinados para o consumo *in natura*, sendo o restante destinado para o processamento agroindustrial, do qual a maior parte é transformada em suco concentrado e congelado direcionado para o mercado externo (ARAÚJO et al., 2014; IBRAF., 2009; SOUSA et al., 2011). Estima-se, que, do total de frutas processadas para a produção de sucos e polpas, entre 30 a 40% do peso seco é descartado como coprodutos agroindustriais, os quais não possuem um destino específico (FILHO e FRANCO, 2015; MARTINS e FARIAS, 2002). O acúmulo de grandes volumes desses coprodutos em locais inadequados representa sério problema de contaminação ambiental, sendo necessário que esse material seja descartado de forma correta e afastado das unidades de processamento (ARAÚJO et al., 2014; BABBAR et al., 2011; NÓBREGA et al., 2015).

Esses coprodutos são constituídos de cascas, sementes, bagaço, talos e outras partes da fruta, que, assim como suas partes comestíveis, são considerados fontes de compostos bioativos, vitaminas e minerais de grande importância para a saúde humana, porém geralmente subutilizados (AYALA-ZAVALA et al., 2011; BATISTA et al., 2018; DUARTE et al., 2017; GORINSTEIN et al., 2011). Devido à elevada quantidade de carboidratos, entre eles, açúcares simples e oligossacarídeos não digeríveis (fruto-oligossacarídeos), assim como, de compostos fenólicos, esses coprodutos têm sido utilizados em ensaios de avaliação de efeitos prebióticos e/ou de estabilidade e recuperação de bactérias probióticas submetidas a processos de secagem e ao longo do armazenamento. Esses estudos têm sugerido que tais

substratos podem apresentar um importante papel sobre culturas de bactérias ácido lácticas (BAL), incluindo àquelas com potencial probiótico, com destaque para o gênero *Lactobacillus* (DOS SANTOS et al., 2017; DUARTE et al., 2017; GULLÓN et al., 2014).

As BAL têm papel considerável nas indústrias de alimentos e biotecnológica, pois são amplamente utilizadas como iniciadoras para a fabricação de diversos alimentos. Dentre elas, destacam-se os probióticos, definidos como suplemento microbiano vivo, que afetam de maneira benéfica o hospedeiro, melhorando o equilíbrio da flora intestinal. Além disso, promovem outros benefícios à saúde, como melhora do metabolismo da lactose, redução do colesterol sérico, aumento da resposta imune, propriedades antimutagênicas e propriedades anti-carcinogênicas (PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011; GARCIA et al., 2016).

Diversas cepas do gênero *Lactobacillus* apresentam potencial probiótico e podem ser incorporadas em diferentes formulações de alimentos (ARGYRI et al., 2013; DI CAGNO; FILANNINO; GOBBETTI, 2016; GARCIA et al., 2016). Para isso, os microrganismos probióticos precisam sobreviver aos tratamentos de concentração e preservação, comumente empregados para sua transformação na forma de comercialização, bem como ser aplicados de forma eficiente na produção de alimentos. Esses processos de desidratação podem afetar a estrutura e os componentes celulares das bactérias, pela mudança do estado físico, resultando em uma perda da viabilidade bacteriana, podendo, assim, comprometer sua atividade metabólica (CARVALHO et al., 2004; STRASSER et al., 2009; TYMCZYSZYN et al., 2007; TYMCZYSZYN et al., 2008).

Para evitar a ocorrência desses danos, diferentes ingredientes como leite desnatado, aminoácidos, glicerol, açúcares (glicose, frutose, sorbitol, manitol, trealose, lactose e sacarose) e fibras dietéticas, incluindo àquelas com propriedades prebióticas, a exemplo de alguns oligossacarídeos não digeríveis (fruto-oligossacarídeos), são geralmente incorporados às culturas probióticas submetidas à desidratação. Nesses processos, tais ingredientes atuam como protetores das culturas bacterianas, principalmente, devido aos efeitos exercidos sobre a membrana celular bacteriana (CHOTIKO e SATHIVEL 2014; GOLOWCZYC et al., 2011; NUNES et al., 2018; ROMANO et al., 2015; TYMCZYSZYN et al., 2011).

Considerando que frutas e seus coprodutos agroindustriais são fontes naturais de açúcares simples e oligossacarídeos não-digeríveis (fruto-oligossacarídeos), como também compostos fenólicos com atividades antioxidantes (ANDRADE et al., 2015; BATISTA et al., 2018; DUARTE et al., 2017; SANCHO et al., 2015), acredita-se que o uso desses coprodutos podem apresentar potencial para estabelecimento de propriedades de proteção de células bacterianas submetidas a processos de secagem, como a liofilização.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito protetor de coprodutos gerados durante o processamento de frutas tropicais sobre cepas de *Lactobacillus* probióticas, especificamente *L. paracasei* L-10, *L. casei* L-26 e *L. acidophilus* LA-05.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PROCESSAMENTO DE FRUTAS E GERAÇÃO DE COPRODUTOS

O crescimento contínuo da produção de frutas tropicais em todo o mundo se dá pela valorização dos seus constituintes promotores de saúde. O Brasil se destaca como um dos principais produtores de frutas, sendo considerado o terceiro maior produtor de frutas no mundo, apresentando uma produção que supera 41 milhões de toneladas, ultrapassando países como os Estados Unidos, Itália e Espanha (GONZALEZ-AGUIAR et al., 2008). Favorecido pela posição geográfica, características do solo e condições climáticas, o Brasil oferece espécies tropicais e subtropicais o ano inteiro (FAO/ONU, 2014; TREICHEL et al., 2016).

As frutas são extremamente perecíveis, o que dificulta a comercialização na forma “*in natura*” para as grandes distâncias. Por esse motivo, a maior parte da produção de frutas é destinada para o setor das agroindústrias, que as utiliza para elaboração de produtos processados, como sucos, geleias, polpas e doces. Esse processamento favorece o consumo de produtos derivados de frutas durante todo o ano, além de agregar valor aos produtos (CAETANO; DAIUTO; VIEITES, 2012).

O processamento de frutas gera elevadas quantidades de coprodutos agroindustriais, constituídos, principalmente de cascas e sementes. O descarte destes coprodutos é um desafio para a indústria, pois comumente não possuem destino específico, tornando-se contaminante ambiental, gerando assim, danos ao meio ambiente e prejuízos econômicos para as empresas (INFANTE et al., 2013; KONG; ISMAIL, 2011; TARGINO PINTO; SOUSA, 2010).

Do total de coprodutos gerados por ano (cerca de 39000 toneladas), 91,7% é oriundo de indústrias alimentícias, e, aproximadamente, 33 toneladas/ano de sementes e 198 toneladas/ano de cascas são descartados pela indústria de polpas, doces, néctares e de frutas que são minimamente processadas (ANDRADE et al., 2015).

A composição desses coprodutos gerados pela indústria é bastante variada e dependente da matéria-prima, condições climáticas, germinação, estágio de maturação, processamento utilizado e condições de armazenamento empregadas. Estes fatores influenciam na composição desses coprodutos, de modo que, se faz necessário estudos prévios da composição de coprodutos agroindustriais, visando avaliar a real viabilidade de aplicações em novas formulações (BALASUNDRAM et al., 2006).

Estudos têm demonstrado que as frutas apresentam uma grande variedade de nutrientes e compostos antioxidantes, sendo que esses constituintes se concentram, principalmente, nas cascas e sementes (BATISTA et al., 2018; IGNAT, VOLF, POPA, 2011; SANCHO et al., 2015). Pesquisa realizada por Deng et al. (2012) demonstrou relação positiva entre os compostos fenólicos e capacidade antioxidante da casca e semente de 50 frutas estudadas, como goiaba, abacaxi, tangerina, maçã, pera e manga. Os autores concluíram que o conteúdo de ácidos fenólicos e o poder antioxidante foram maiores nas cascas e sementes quando comparado com os valores encontrados nas polpas das frutas analisadas.

Outras pesquisas recentes mostraram que compostos fenólicos comumente presentes em frutas podem estimular o crescimento de bactérias benéficas, podendo exercer uma função prebiótica, sugerindo uma relação mútua entre compostos fenólicos e probióticos (LLANO et al., 2017; OZDAL et al., 2016; SUCCI et al., 2017).

Nesse contexto, o aproveitamento de coprodutos agroindustriais de frutas torna-se essencial para à redução de impactos ambientais causados pela acumulação no ambiente. Assim, a geração de uso alternativo pode agregar valor a tais produtos, principalmente na indústria alimentícia (ALBUQUERQUE et al., 2015; INFANTE et al., 2013).

### **2.1.1 Acerola (*Malphigia emarginata* D.C.)**

A acerola (*Malphigia emarginata* D.C.) é a fruta da aceroleira, tem origem na América do Sul e Central, sendo cultivada em regiões de clima tropical. O Brasil é considerado o maior produtor mundial de acerola, sendo também o principal consumidor e exportador da fruta (LEFFA et al., 2014; CAVICHIOLI et al., 2014). O país possui plantios de acerola em praticamente todos os estados, destacando-se Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco, que são responsáveis por, aproximadamente, 60% da produção nacional (FURLANETO; NASSER, 2015).

A acerola apresenta-se como uma fruta de fácil cultivo, carnosa, variando na sua forma, tamanho e peso, sendo constituída pelo epicarpo (casca externa), mesocarpo (polpa da fruta) e endocarpo (constituído de três caroços unidos), que dá à fruta aspecto trilobado (Figura 1). No interior de cada caroço está presente a semente, com 3 a 5 mm de comprimento, com forma ovoide e com dois cotilédones (ALMEIDA et al., 2011). Seu aroma e sua composição química são dependentes das condições climáticas e do estágio de maturação da fruta (NOGUEIRA, 2002).

**Figura 1** – Fruto da Aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.).



Fonte: Marques, 2008.

A acerola é um alimento de baixo valor calórico, reconhecida em todo o mundo pelo alto teor de vitamina C (941 mg/100 g) (TACO, 2011), o qual é superior ao encontrado na laranja e goiaba, que são frutas consideradas fontes dessa vitamina. Além disso, apresenta altas concentrações de vitaminas A, do complexo B e minerais, como ferro, fósforo e cálcio, bem como de compostos fenólicos e flavonóides. Com isso, despertar o interesse da indústria sobre o aproveitamento industrial de coprodutos do processamento da acerola se faz necessário, devido ao seu potencial de promover maior desenvolvimento do agronegócio regional (LEFFA et al., 2014; FURLANETO; NASSER, 2015).

Estudo realizado por Sousa e Vieira (2011) para avaliar a capacidade antioxidante de coprodutos de polpas de frutas mostrou que o coproduto de acerola apresentou maior capacidade antioxidante em comparação com os demais coprodutos de frutas analisadas. Outro estudo, sobre a quantificação de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante de diferentes coprodutos de frutas, relatou que o extrato obtido do coproduto da acerola pode ser utilizado como suplementos antioxidantes devido ao seu alto conteúdo fenólico (OLIVEIRA et al., 2009).

### **2.1.2 Caju (*Anacardium occidentale* L.)**

O caju é a fruta do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), pertencente à família das Anacardeáceas, nativa do Brasil, com características sensoriais e nutricionais distintas. O caju é amplamente explorado e comercializado mundialmente, sendo o Brasil, Índia e Vietnã os países que apresentam maior produção mundial. Ainda, é considerada como uma das

principais frutas comercializadas no Brasil, tendo destaque a região Nordeste na produção e comercialização. Adaptada ao clima tropical, o caju é responsável pela maior parte do agronegócio da região nordeste, com produção de 217,062 toneladas de castanha e 2 milhões de toneladas de pseudofruto por ano (ABREU et al., 2013; CIANCI et al., 2005; PINHO et al., 2011).

O caju é uma fruta de alto valor nutricional, encontrada nas cores amarelo, laranja e vermelho, com polpa amarelo pálido (Figura 2), pesando cerca de 75-80 g, com 6-10 cm de comprimento (GARRUTI et al., 2003; TALASILA; SHAIK, 2015). É formada por duas partes: i) a castanha, a qual é definida como o verdadeiro fruto, contendo no seu interior a amêndoa, sendo o principal produto de exportação; ii) e o pedúnculo, que é o seu pseudofruto, com característica de adstringência, sabor forte e exótico, conteúdo carnosos e fibroso, sendo considerado bastante nutritiva (CARR, 2014). Apresenta pele sensível a danos mecânicos durante o processamento pós-colheita (manuseio, embalagem e transporte). Por isso, os pseudofrutos estão sujeitas a tensões que podem acarretar alterações fisiológicas e metabólicas, gerando amolecimento do tecido, perda de sabor e cor, exigindo, assim, maiores cuidados, principalmente, com o transporte (BARRETO et al., 2007).

**Figura 2** – Fruto do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.).



Fonte: Marques, 2008.

O pseudofruto apresenta bons teores de ácido ascórbico (219,3 mg/100 g) (TACO, 2011), sais minerais, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e carboidratos. Também apresenta vários compostos com capacidade antioxidante, como carotenóides, flavonóides, ácidos fenólicos, taninos e ácido anacárdico (LEMMENS et al., 2009).

A indústria utiliza o caju como matéria-prima para a fabricação de diversos produtos alimentícios, sendo o pedúnculo do caju utilizado para a produção de sucos, doces,

refrigerante, néctar e polpa congelada (QUEIROZ et al., 2011; ANDRADE et al., 2015). Cerca de 1,8 milhões de toneladas de caju são processadas anualmente para obter a castanha e mais de 80% dos pedúnculos (pseudofruto) são descartados após a remoção da amêndoa (ALBUQUERQUE et al., 2015; TALASIL; SHAIK, 2015).

O estudo de Albuquerque et al., (2015), avaliou o uso do hidrolisado do coproduto do caju, visto ser rico em celulose e hemicelulose, como meio potencial para a produção biotecnológica de xilitol, agregando valor a este coproduto na indústria. Outro estudo realizou a quantificação de antocioninas, compostos fenólicos, vitamina C, ácidos graxos insaturados, manganês e fósforo em diversos coprodutos de frutas. Nesse estudo, o caju se caracterizou como boa fonte de manganês e de ácido graxos insaturados (SANCHO et al., 2015). Duarte et al. (2017) avaliaram os efeitos prebióticos do coproduto do pedúnculo de caju sob cepas probióticas, resultando em uma intensa atividade metabólica bacteriana, podendo ser utilizado como um ingrediente de valor na indústria alimentícia.

### 2.1.3 Goiaba (*Psidium guajava* L.)

A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma fruta amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais, sendo considerada como uma das frutas tropicais de maior popularidade para a agroindústria, não só devido ao seu elevado valor nutritivo, mas pela excelente aceitação do consumo *in natura* (MAIA; FIGUEIREDO; SANTOS, 2002).

Os principais países produtores são África do Sul, Índia, Colômbia, Porto Rico, Jamaica e Brasil, onde existem aproximadamente 324 espécies de goiabas (THOMAZ, 2014). Sua produção em território brasileiro representa, aproximadamente, 280 mil toneladas, concentradas nos meses de fevereiro a março, embora sua comercialização da fruta ocorra o ano inteiro (ZANATTA; ZOTARELLI; CLEMENTE, 2006).

A goiabeira é uma planta de pequeno porte, que pode atingir de 3 a 6 metros de altura. A fruta apresenta forma arredondada ou baga globosa, ovoide ou piriforme, de 4 a 12 cm de comprimento (Figura 3). Pode ser consumida tanto *in natura* como industrializada na forma de geleias, sucos, compotas, doces e outros produtos (ALVES; FREITAS, 2007). Apresenta em sua composição nutrientes como vitamina C e vitamina E, sendo rica em zinco e niacina. Ainda, apresenta elevados teores de selênio, cobre, fósforo, magnésio, cálcio, ferro, ácido fólico e vitaminas A, B1, B2 e B6, compostos fenólicos e fibras dietéticas (UCHÔA-THOMAZ et al., 2014).

**Figura 3** – Fruto da goiabeira (*Psidium guajava* L.).



Fonte: Marques, 2008.

Na indústria de processamento, a utilização da goiaba gera coprodutos, que correspondem, aproximadamente, 25% do peso da fruta. Estudo realizado por Sancho et al. (2015) mostrou que o coproduto de goiaba apresentou boas quantidades de antocianinas, principalmente, quando comparados à porção comestível da fruta. Com base nessas informações, estudos que explorem a utilização desses coprodutos são necessários para avaliar o potencial de uso como matriz para a obtenção de novos produtos de interesse da indústria.

## 2.2 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS: CONCEITO E PRESERVAÇÃO

As BAL são ferramentas biotecnológicas importantes para os diversos setores da indústria, sendo amplamente utilizadas como culturas iniciadoras e como probióticos. Entre as BAL, o gênero *Lactobacillus* tem recebido destaque para a seleção de espécies probióticas, sendo utilizadas em formulações de diversos produtos (ARGYRI et al., 2013; SUN et al., 2015).

Os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (WHO/FAO, 2002). Sendo esse conceito o mais adotado e aceito mundialmente (HEALTH CANADA, 2009; HILL et al., 2014).

Entre os principais benefícios das culturas probióticas se destacam o equilíbrio da microbiota intestinal, diminuição da população de patógenos, promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (KAUR; CHOPRA; SAINI, 2003; SAAD, 2006; SAAD et al., 2012;

TUOHY et al., 2003). Estudos de Rijkers et al. (2011) assim como de Oliveira e Gonzales-Molero (2016) relatam o efeito positivo de probióticos na prevenção e tratamento da diarreia associada à ingestão de antibióticos e enterocolite necrosante, como também que o consumo de probióticos pode estimular vários componentes do sistema imunológico. Outros estudos (LI et al., 2014; SADRZADEH-YEGANEH et al., 2010; ZHANG et al., 2017) confirmam que a administração de cepas probióticas pode modular o metabolismo lipídico, e também exercer ação hipolipemiante, podendo ser utilizado no controle dos desequilíbrios decorrentes da obesidade (ZHANG et al., 2017).

De acordo com Webb (2011), para se gerar benefícios à saúde do hospedeiro, os probióticos devem ser capazes de sobreviver à passagem através do estômago e colonizar o cólon. Sendo, o baixo pH do estômago e as altas concentrações de ácidos biliares no cólon os principais obstáculos para a sobrevivência dos probióticos, o que também dificulta o crescimento de bactérias patogênicas (SERBAN, 2011).

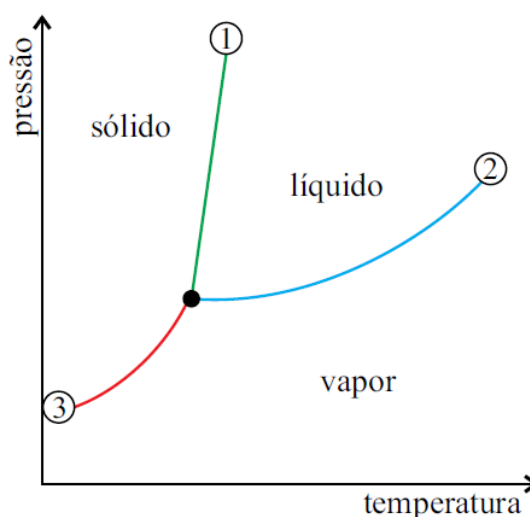
O conceito da FAO/WHO (2002) não estabelece exatamente uma quantidade adequada de microrganismos probióticos que possa gerar benefícios para a saúde do hospedeiro. A legislação brasileira afirma que as alegações de saúde reivindicadas para determinada cepa deverão ser comprovadas caso a caso com estudos que claramente confirmem que determinada dose viável de células quando ingerida irá fornecer os efeitos alegados (BRASIL, 2016). Apesar disso, autores sugerem quantidades mínimas de  $10^6$  -  $10^7$  de UFC por g ou mL de células viáveis do microrganismo probiótico em produtos alimentícios para que possam proporcionar benefícios à saúde (CHARALAMPOPOULOS, 2011; GEBARA et al., 2015).

Para sua transformação na forma de comercialização, tratamentos de preservação são comumente aplicados aos microrganismos probióticos, tais como liofilização e *spray-drying*, que visam garantir maior estabilidade das culturas em termos de viabilidade e atividade funcional (CARVALHO et al., 2004; LESLIE et al., 1995). Vários fatores podem influenciar na sobrevivência das cepas bacterianas durante os processos de preservação, como população inicial de microrganismos, meio de crescimento, utilização de crioprotetores, métodos de secagem e condições de armazenamento (STRASSER et al., 2008; TEIXEIRA et al., 1995).

A liofilização é um dos métodos de desidratação mais utilizados pela indústria de alimentos para a preservação de cepas bacterianas, o qual consiste na remoção da água, a amostra é congelada (formação de cristais de gelo) e subsequentemente com sublimação do gelo (Figura 4) associada à baixa pressão (FONSECA et al., 2015; STRASSER et al., 2008). Durante esse processo, a redução de atividade de água causa injúrias nas estruturas

bacterianas, particularmente, nas membranas e proteínas, comprometendo o funcionamento, viabilidade e, conseqüentemente, a atividade metabólica das células bacterianas, os quais podem ser irreparáveis (ROMANO et al., 2016). Além disso, a oxidação pode ser um mecanismo de dano celular durante a desidratação e armazenamento (CARVALHO et al., 2004). Apesar disso, a liofilização é uma técnica de desidratação superior quando comparada com as demais existentes, sendo considerado o método que causa menor dano na célula bacteriana, por isso, é o mais empregado pela indústria biotecnológica.

**Figura 4** – Diagrama de fases da água e os processos de separação do liofilizador.



Fonte: El-Bachá, 2014.

Para reduzir a ocorrência de danos na membrana da célula bacteriana à indústria utiliza ingredientes, os quais são incorporados às culturas bacterianas durante os processos de desidratação (principalmente antes do congelamento). Esses agentes atuam na substituição da água que está no interior das células da bactéria, estabilizando os lipídeos e proteínas da membrana celular, favorecendo a manutenção da integridade funcional das células desidratadas (LESLIE et al., 1995; SANTIVARANGKNA et al., 2011; SCHWAB et al., 2007; STRASSER et al., 2008).

Exemplos desses ingredientes, glicose, sacarose, maltose, lactose e trealose, bem como as maltodextrinas, aumentaram a viabilidade de BAL durante o congelamento e liofilização (DE GUILIO et al., 2005; OLDENHOF et al., 2005). Açúcares, como os galacto-oligossacarídeos (GOS) e lactulose demonstraram boas propriedades protetoras durante os processos de desidratação (TYMCZYSZYN et al., 2011; TYMCZYSZYN et al., 2012). Shu



et al. (2012) relataram efeito protetor de fruto-oligossacarídeos (FOS), isomalto-oligossacarídeos, inulina e xiloxigossacarídeos em *B. bifidum* liofilizado. FOS também se mostrou com efeito protetor sobre *L. acidophilus* e *Lactococcus cremoris* durante a liofilização, secagem por pulverização e posterior armazenamento (DIANAWATI et al., 2013). Um estudo sobre a utilização do subproduto da soja denominado de okara, demonstrou ser uma matriz inovadora capaz de estabilizar o *Lactobacillus plantarum* durante o processo de desidratação e liofilização, sendo considerado um ingrediente com promissoras aplicações na indústria (QUINTANA et al., 2017).

O efeito protetor desses compostos utilizados nos estudos descritos acima durante a liofilização é atribuído às interações diretas com proteínas e membranas. Além disso, se o teor de água desses compostos protetores for baixo, os açúcares irão formar uma matriz vítrea que é caracterizada por alta viscosidade e baixa mobilidade (CROW et al., 1973; SCHWAB et al., 2007).

A análise das células de forma individual utilizando a citometria de fluxo (CF) tem sido empregada para avaliar a integridade das membranas bacterianas após processos de desidratação, verificando os efeitos desses ingredientes protetores adicionados às cepas. É uma técnica de avaliação celular de grande poder, sendo utilizada para indicar processos celulares específicos, tais como atividade respiratória, atividade enzimática, absorção de substrato, atividade de bomba de efluxo, potencial de membrana e/ou integridade de membrana (HAMMES et al., 2011). Essa técnica tem se mostrado de grande valia para analisar rapidamente a célula bacteriana, podendo ser aplicada em diversos campos de estudo da microbiologia (SCHENK et al., 2011).

Considerando que frutas e seus coprodutos apresentam na sua composição açúcares simples, oligossacarídeos não-digeríveis (fruto-oligossacarídeo) e compostos fenólicos, (Ayala-Zavala et al., 2011; Batista et al., 2018; Sancho et al., 2015) acredita-se que o uso destes coprodutos podem apresentar potencial para estabelecimento de propriedades de proteção de células bacterianas submetidas a processos biotecnológicos de desidratação, como a liofilização. Assim, essas informações reforçam a importância da utilização destes coprodutos por parte da indústria biotecnológica, agregando valor e contribuindo para aplicações promissoras no desenvolvimento de novos alimentos e alimentos funcionais, além da reduzir o impacto ambiental que o descarte incorreto destes pode causar.

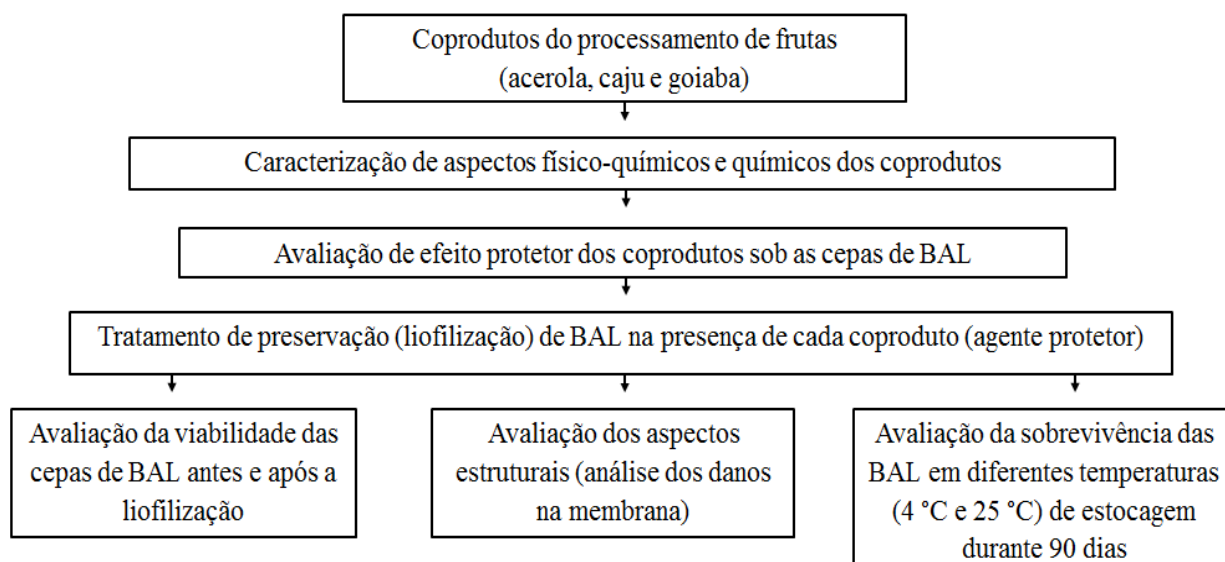
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Alimentos (LMBA) e no Laboratório de Bromatologia (LB) do Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), *Campus* I, João Pessoa - PB; no Laboratório Experimental de Alimentos (LEA), do Departamento de Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Petrolina – PE; e no Laboratório de Bromatologia de Alimentos (LABROM), da Unidade Acadêmica de Saúde, da Universidade Federal de Campina Grande, *Campus* de Cuité/PB.

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O desenho do experimento desenvolvido no presente estudo encontra-se exposto na Figura 5, onde se descreve todas as análises que foram realizadas em triplicata.

**Figura 5.** Delineamento experimental da dissertação intitulada “EFEITO PROTETOR DE COPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE FRUTAS TROPICAIS EM CEPAS PROBIÓTICAS *Lactobacillus* APÓS LIOFILIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO”.



Fonte: Próprio autor, 2019.

### 3.2 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS COPRODUTOS DE FRUTAS

Os coprodutos de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), caju (*Anacardium occidentale* L.) e goiaba (*Psidium guayaba* L.) foram obtidos da empresa Pé de Fruta, localizada na cidade João Pessoa/PB. Esses coprodutos consistiam, principalmente, de cascas, sementes, bagaço e um pouco da polpa esmagada. Essas amostras foram coletadas de diversos lotes do processamento das frutas, totalizando cerca de 6 kg para cada fruta. Em seguida, os coprodutos foram colocados assepticamente em sacos comercialmente esterelizados, acondicionados e transportados em caixas isotérmicas com gelo até o Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba, *Campus I* – João Pessoa/PB. Esse material foi congelado a uma temperatura de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  e posteriormente liofilizado (liofilizador L-101 modelo LIOTOP®, São Carlos, Brasil) a uma temperatura de  $-55 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com pressão de vácuo  $<138\text{ }\mu\text{HG}$ , (velocidade de liofilização de 1 mm/h), por, aproximadamente, 12 h. O material já liofilizado foi triturado usando um misturador doméstico (em baixa velocidade por 10 min) e peneirado através de uma malha fina para obter um pó com um tamanho médio de partícula  $<1,0\text{ mm}$  (Figura 6) O produto final (pó) foi armazenado a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  em sacos de polipropileno laminados comercialmente esterelizados até a realização dos ensaios.



**Figura 6.** Coprodutos *in natura* e liofilizados de acerola (A), caju (B) e goiaba (C), respectivamente.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COPRODUTOS LIOFILIZADOS

#### 3.3.1 Análises físico-químicas

Os açúcares (glicose, frutose e maltose) foram determinados conforme descrito por Ball et al. (2011) por meio de técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando cromatógrafo AGILENT® (modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), equipado com bomba quaternária de solventes (modelo G1311C), degaseificador, compartimento de colunas termostaticado (modelo G1316A) e amostrador automático (modelo G1329B), acoplado em Detector de Arranjos de Diodos (DAD) (modelo G1315D) e Detector de Índice de Refração (RID) (modelo G1362A). Os dados obtidos foram processados utilizando o “software” OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies). Os padrões de glicose e frutose foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA); maltose foi obtido da Chem Service (West Chester, EUA). A água ultrapura foi obtida em sistema MilliQ®.

O procedimento analítico seguiu recomendações previamente descritas por Ball et al. (2011). Para determinação dos açúcares maltose, glicose e frutose, a detecção foi feita no RID. A coluna utilizada foi a Agilent Hi-Plex H (300 x 7,7 mm) com partículas internas de 8,0 µm, protegida com uma coluna de guarda PL Hi-Plex H 5x3 mm (Agilent Technologies). As temperaturas do forno de colunas e detector foram mantidas em 50 °C. O volume de injeção da amostra (previamente diluída em água ultrapura e filtrada em membrana de 0,45 µm) foi de 10 µL, com fluxo de 0,5 mL/min e tempo de corrida de 20 min. A fase móvel utilizada foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,0 mM/L em água ultrapura.

#### 3.3.2 Determinação do perfil de compostos fenólicos e do teor de compostos fenólicos totais, flavonóides totais e atividade antioxidante *in vitro*

##### *Padrões e reagentes químicos*

Carbonato de sódio, nitrito de sódio, cloreto de alumínio, cloreto férrico, hidróxido de sódio, acetato de sódio, sulfato ferroso, persulfato de potássio, etanol, metanol, Folin-Reagente Ciocalteu, Reagente TPTZ (Sal de 2,4,6-Tri-(2-Piridil)-1,3,5-Triazina 1:3 com Ácido p-Toluenosulfônico), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), Reagente ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium

salt, 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)], AzBTS-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Diammonium 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)], 2,2'-) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Água ultrapura foi obtida em um sistema de purificação da Marte Científica (São Paulo, SP, Brasil). Padrões externos de ácido gálico, ácido siríngico, hesperidina, naringenina, procianina B1, catequina, procianidina B2, ácido cafárico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido cumárico, cianidina 3,5-glicosídeo, pelargonidina 3,5-glicosídeo e perlagonidina 3-glicosídeo foram adquiridos Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Epicatequina, galato de epicatequina, procianidina A2, quercetina 3-glicosídeo, rutina, kaempferol 3-glicosídeo e petunidina 3-glicosídeo (Genay, France). O trans-resveratrol e o cis-resveratrol foram obtidos da Cayman Chemical Company (Michigan, EUA)

### 3.3.2.1 Perfil de fenólicos

Os compostos fenólicos individuais foram determinados seguindo a metodologia validada por Padilha et al. (2017), com adaptações no gradiente e tempo de execução para quantificação de estilbenos, flavonóis e flavonas, utilizando um cromatógrafo líquido Agilent 1260 Infinity System LC (Agilent Technologies, Santa Clara - EUA) acoplado a um detector de arranjo de diodo (DAD) (modelo G1315D). Os dados foram processados usando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies, Santa Clara-EUA). A coluna utilizada foi a Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (100 × 4,6 mm, 3,5 µm) e a pré-coluna foi a Zorbax C18 (12,6 × 4,6 mm, 5 µm) (Zorbax, EUA). A temperatura do forno foi de 35 °C e o volume de injeção foi de 20 µL da amostra, previamente diluída na fase A, e filtrada através de membrana de 0,45 µm (Millex Millipore, Barueri, SP, Brasil). O fluxo de solvente foi de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. O novo gradiente utilizado na separação foi de 0 a 5 min: 5% B; 5 a 14 min: 23% de B; 14 a 30 min: 50% de B; 30-33 min: 80% B, em que o solvente A era uma solução de ácido fosfórico (0,1 M, pH = 2,0) e o solvente B era metanol acidificado com 0,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. A detecção dos compostos foi realizada a 220, 280, 320, 360 e 520 nm, e a para a identificação e a quantificação por comparação com padrões externos.

### 3.3.2.2 Compostos fenólicos totais, flavonóides totais e atividade antioxidante *in vitro*

#### *Obtenção do Extrato*

Para a extração dos compostos das amostras utilizou-se metodologia descrita por Sousa et al. (2011), com adaptações. Inicialmente usou 100 mL de metanol 80% e 10 g de amostra, foram homogeneizados em frasco Erlenmeyer (coberto com papel alumínio) usando o agitador magnético (Modelo AGTD-15I, marca Anagel) em chapa agitadora durante 1 h à temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C). Em seguida, a mistura foi centrifugada (Modelo 80-2B, marca Centribio) a 4000 rpm por 10 min, à temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C), o sobrenadante filtrado e armazenado em vidro âmbar para realização das análises.

#### *Determinação de Compostos Fenólicos Totais (CFT)*

Para determinar o teor de compostos fenólicos totais dos coprodutos utilizou-se metodologia descrita por Liu et al. (2002), com modificações. Resumidamente, 250 µL de cada extrato foram misturados em tubo de ensaio com 1250 µL do reagente Folin-Ciocalteu 10%. As soluções foram agitadas em Vortex (Modelo Q220M, marca Quimis) e armazenadas em temperatura ambiente (23 °C) na ausência da luz por 6 minutos. Após, foram adicionados 1000 µL da solução de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi levada ao banho maria (Modelo BS-3030, marca Raypa) a uma temperatura de 50 °C durante 5 min. Em seguida, a absorbância foi medida a 765 nm utilizando espectrofotômetro (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Também foi realizado um branco com a ausência dos extratos para zerar o espectrofotômetro. O conteúdo de compostos fenólicos totais das amostras foi determinado utilizando uma curva padrão preparada com ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por cem gramas de amostra (mg EAG/100 g).

#### *Determinação de Flavonoides Totais*

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com o método proposto por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999). Uma alíquota de 0,5 mL dos extratos fenólicos foram adicionados a 2 mL de água destilada em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 150 µL de nitrito de sódio a 5%. Após 5 min, 150 µL de cloreto de alumínio a 10% foram adicionados e, após 6 min, 1 mL de hidróxido de sódio a 1 M, seguido pela adição de 1,2 mL de água destilada. A absorbância da amostra foi medida a 510 nm usando um espectrofotômetro (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brasil) contra um branco na ausência dos extratos. O teor de flavonoides totais foi determinado usando uma curva padrão

de equivalentes de catequina (EC). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina (EC) por cem gramas de amostra (mg EC/100 g).

#### *Atividade Antioxidante in vitro - Método FRAP*

Para determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi utilizada metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), adaptada por Rockenbach et al. (2011). O reagente FRAP foi preparado somente no momento da análise, utilizando uma mistura de 11 mL de tampão acetato (0,3M, pH 3,6), 1,1 mL de solução TPTZ (10 mM em HCl 40 mM) e 1,1 mL de solução aquosa de cloreto férrico (20 mM). Para a análise, 200 µL dos extratos foram adicionados a 1800 µL do reagente FRAP em um tubo de ensaio e levados ao banho maria a 37 °C por 30 minutos. Para cada extrato foi realizado um teste branco, sem adição do extrato. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 593 nm. Para determinar a atividade antioxidante (FRAP) foi utilizada curva de calibração com Trolox e os resultados foram expressos em µmol de trolox/g de amostra.

#### *Atividade Antioxidante in vitro - Método ABTS*

O método ABTS foi realizado de acordo com a metodologia de Sariburun et al. (2010), com algumas modificações. Inicialmente, formou-se o radical ABTS através da reação da solução ABTS<sup>•+</sup> a 7 mM com a solução de persulfato de potássio 140 mM incubados a temperatura de 25 °C, no escuro durante 12-16 horas. Uma vez formado o radical, o mesmo foi diluído em água destilada até obter o valor de absorbância de 0,800 (±0,020) a 734 nm. A partir de cada extrato foram preparadas quatro diluições diferentes, em triplicatas. Em ambiente escuro, foi transferida para um tubo de ensaio uma alíquota de 100 µL dos extratos e adicionado 500 µL do radical ABTS. Após, os tubos de ensaio foram mantidos na ausência de luz por 6 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura a 734 nm em espectrofotômetro (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Também foi feita uma solução “controle” que consistiu em uma alíquota de 100 µL do solvente extrator dos extratos adicionada de 500 µL do radical ABTS. A solução “branca” foi o solvente extrator de cada extrato, utilizada para zerar o espectrofotômetro. Como referência, foi utilizado o Trolox e os resultados expressos em µM trolox/g de amostra.

### 3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DOS COPRODUTOS LIOFILIZADOS SOB AS CEPAS DE *Lactobacillus*

#### 3.4.1 Microrganismos, preparação do inóculo e tratamentos

Diferentes cepas de *Lactobacillus* potencialmente probióticas, nomeadas de *L. acidophilus* LA-05, *L. paracasei* L-10 e *L. casei* L-26 (DUARTE et al., 2017; NUNES et al., 2018; SOUSA et al., 2015), foram utilizadas no presente estudo. Estas cepas foram obtidas da Coleção de Microrganismos da Faculdade de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto (Porto, Portugal). As culturas estoque foram mantidas em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (CMRS; Himedia, Mumbai, Índia) contendo glicerol (150 g/L) sob temperatura de -20 °C. Para obtenção do inóculo, as cepas teste supracitadas foram cultivadas anaerobicamente (Anaerogen System Anaerogen, Oxoid) em CMRS a 37 °C até atingir a fase estacionária de crescimento (20-24 h de incubação). A massa celular foi coletada por centrifugação (4000 g x 10 minutos, a 4 °C), lavada duas vezes em solução salina esterelizada (NaCl 8,5 g/L) e ressuspensa em cinco diferentes tratamentos, como apresentados no Quadro 1.

**Quadro 1** – Tratamentos utilizados no estudo.

<b>Código</b>	<b>Suspensões das cepas</b>
<b>CNE</b>	Água destilada esterilizada (controle negativo)
<b>FOS</b>	Fruto-oligossacarídeos (2% p/v, controle positivo)
<b>ACE</b>	Coproduto de acerola (2% p/v)
<b>CAJ</b>	Coproduto de caju (2% p/v)
<b>GOI</b>	Coproduto de goiaba (2% p/v)

Essas suspensões continham contagens de células viáveis de, aproximadamente, 10 log UFC mL<sup>-1</sup> (com leitura da densidade óptica (OD) a 625 nm (OD<sub>625</sub>) correspondendo a 1,5). As suspensões contendo os coprodutos de frutas tiveram pH final variando de 3,24 - 5,12. Em seguida, todas as suspensões foram transferidas (quantidade de 2 mL) para frascos de vidro (5



mL) com tampa sob condições assépticas e submetidas ao congelamento (-80 °C) durante 24 horas.

### **3.4.2 Liofilização das cepas de *Lactobacillus***

As suspensões bacterianas contendo os coprodutos, bem como os controles positivo e negativo congelados, foram submetidas ao processo de liofilização em temperatura de  $-55 \pm 2$  °C, com pressão de vácuo  $<138$  µHG, velocidade de liofilização 1 mm/h, por, aproximadamente, 40 h, utilizando liofilizador de bancada (Modelo L-101, marca LIOTOP®, São Carlos-SP, Brasil).

### **3.4.3 Avaliação da viabilidade das cepas de *Lactobacillus* após a liofilização**

Para avaliar o efeito da liofilização sobre a viabilidade das cepas de *Lactobacillus* testadas na ausência (CNE) ou presença dos diferentes substratos (FOS, ACE, CAJ e GOI), foi realizada a contagem de células viáveis das cepas antes (tempo 0, logo após o preparo da suspensão das cepas) e em diferentes intervalos após o processo de secagem (nos tempos 0 – imediatamente após a secagem, 6, 12, 24 e 48 h). Para isso, as cepas desidratadas nos diferentes tratamentos foram reidratadas em água destilada esterilizada em temperatura ambiente ( $25 \pm 0,5$  °C) por 15 minutos. Em seguida, diluições seriadas foram realizadas utilizando solução salina esterilizada (NaCl 8,5 g/ L) e dispensadas em placas contendo ágar MRS (HiMedia, Mumbai, Índia) utilizando-se a técnica de inoculação em microgota (HERIGSTAD, HAMILTON e HEERSINK, 2001). As placas foram incubadas anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) a 37 °C durante 48 h, e os resultados das contagens foram expressos como log UFC/mL.

### **3.4.4 Avaliação de danos na membrana de *Lactobacillus* após a liofilização**

A análise de citometria de fluxo (CF) foi utilizada para monitorar a ocorrência de danos nas membranas das cepas de *Lactobacillus* testadas na ausência (CNE) ou presença de FOS, ACE, CAJ ou GOI após o processo de liofilização. Para isso, as cepas desidratadas nos diferentes tratamentos foram reidratadas em água destilada esterilizada em temperatura ambiente ( $25 \pm 0,5$  °C) por 15 minutos, e, em seguida, filtradas individualmente com uso de membrana de 0,45 µm. Após isso, as amostras foram centrifugadas (4500 g x 10 min, 4 °C) e

os *pellets* obtidos foram, então, lavados duas vezes e ressuspensos em solução salina tampão fosfato esterilizada (STF; NaCl 8,0 g/L; KCl 0,20 g/L; 1,44 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) e imediatamente marcados com iodeto de propídio (IP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para avaliar a integridade da membrana; trimetina oxonol do ácido bis-1,3-dibutilbarbitúrico (DiBAC<sub>4</sub>(3) ou BOX, Molecular Probes, Invitrogen, OR, EUA) para verificar alteração no potencial de membrana; e brometo de etídio (BE; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para avaliar alteração na atividade de bomba de efluxo (CARRILLO et al., 2018; KIM et al., 2017; SILVA et al., 2011).

#### *Integridade e potencial de membrana*

Os *pellets* das células suspensas em PBS foram incubados na presença de IP (1 µg/mL) e DiBAC<sub>4</sub>(3) (1 µg/mL) ao abrigo da luz por 10 e 30 min, respectivamente, a 37 °C. Após o período de exposição à coloração, as amostras foram centrifugadas (4500 g x por 10 min, 4 °C) e lavadas com igual volume de STF para remover o excesso de corante. Os sedimentos celulares foram novamente suspensos em STF e analisados em citômetro de fluxo (KIM et al., 2017).

#### *Atividade do efluxo*

Os *pellets* das células suspensas em STF com glicose a 1% (p/v) foram incubados na presença de BE (5 µg/mL) por 5 min a 37 °C com proteção à exposição a luz. As amostras foram submetidas ao processo de centrifugação (4500 g x 10 min, 4 °C) e lavadas com STF. Os sedimentos celulares foram suspensos em PBS e analisados em citômetro de fluxo (SILVA et al., 2011).

#### *Análise de CF*

As medições de CF foram realizadas utilizando citômetro de fluxo equipado com um laser de íons de argônio a 488 nm (BD Accuri C6, New Jersey, EUA). As fluorescências verde e vermelha foram coletadas nos canais FL1 (533 nm ± 30 nm) e FL3 (> 670 nm), respectivamente. Sinais de dispersão e fluorescência de células individuais que passam pela zona do laser foram coletados como sinais logarítmicos. O sinal de fluorescência (medições da área de pulso) foi coletado por filtros de banda FL1 (DiBAC<sub>4</sub>(3) e FL3 (PI e EB). O nível

dos limiares para a aquisição de dados foi definido para FSC (12000) a fim de eliminar o fundo e os sinais de detritos considerados muito menores do que a bactéria intacta. As células da bactéria foram identificadas por parâmetros FSC/SSC. Cada aquisição de amostra foi operada em baixa taxa de fluxo e um total de 10000 eventos foram analisados. Todos os citogramas de emissões de fluorescência foram registrados usando o Software BD Accuri C6 (BD®, Becton Dickinson e Company, Franklin Lakes, NJ, EUA).

A análise do gráfico de densidade de SSC *versus* FL1 ou FL3 foi aplicada para determinar as propriedades de fluorescência das populações IP<sup>+</sup>, DiBAC<sub>4</sub>(3)<sup>+</sup> e BE<sup>+</sup>, respectivamente, indicando células com dano na permeabilidade da membrana, membrana despolarizada e bomba de efluxo alterada, respectivamente, as quais tiveram as suas populações identificadas por meio de retângulos localizados no lado direito dos gráficos.

#### **3.4.5 Avaliação da viabilidade das cepas teste durante estocagem**

As cepas liofilizadas (contagens de, aproximadamente, 7 - 10 log UFC/mL) na ausência (CNE) ou presença dos diferentes substratos (FOS, ACE, CAJ e GOI) foram estocadas em vials, os quais foram acondicionados em dessecadores contendo sílica gel para controle da umidade relativa e armazenados sob temperatura de refrigeração ( $4 \pm 0,5$  °C) e ambiente ( $25 \pm 0,5$  °C) por 90 dias. Durante o armazenamento, em intervalos regulares de 15 dias, as cepas liofilizadas na ausência ou presença de substratos foram reidratadas em água destilada esterilizada em temperatura ambiente ( $25 \pm 0,5$  °C) por 15 minutos. As suspensões bacterianas foram diluídas em série em água peptonada esterilizada (0,1 g/100 mL) e inoculadas em placas com ágar MRS utilizando-se a técnica de inoculação por microgotas (HERIGSTAD, HAMILTON e HEERSINK, 2001), seguindo-se por incubação a 37 °C durante 48 h em condições de anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). Os resultados foram expressos como log UFC/mL.

O limite de detecção dos ensaios para contagem de células viáveis foi 1 log UFC/mL.

#### **3.5 Análises estatísticas**

As análises foram realizadas em duplicata em dois diferentes experimentos e os resultados expressos como médias e desvios-padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, utilizando  $p \leq 0,05$ . Para isso, foi utilizado o software Graphpad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 4 RESULTADOS

Segundo normas estipuladas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição (CCS/UFPB), em nível de Mestrado, a seção de “Resultados” da Dissertação deve ser apresentado em forma de artigo, a qual, deve ser elaborado e submetido para publicação em periódicos classificados em Qualis mínimo B2 na a área da Nutrição na CAPES. Sendo assim, o formato de apresentação do artigo segue as normas de “instruções aos autores” da revista ao qual foi submetido.

O artigo intitula-se **“Protective effects of tropical fruit processing co-products on probiotic *Lactobacillus* strains after freeze-drying and storage”**, o qual localiza-se no apêndice.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, F. P.; DORNIER, M.; DIONISIO, A. P.; CARAIL, M.; CARIS-VEYRAT, C.; DHUIQUE-MAYER, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 25-31, 2013.
- AJILA, C. M.; BHAT, S. G.; RAO, U. J. S. P. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1006-1011, 2007.
- ALAMAR, P. D.; CARAMÊS, E. T. S.; POPPI, R. J.; PALLONE, J. A. L. Quality evaluation of frozen guava and yellow passion fruit pulps by NIR spectroscopy and chemometrics. **Food Research International**, v. 85, n. 7, p. 209-214, 2016.
- ALBUQUERQUE, T. L.; GOMES, S. D. L.; MARQUES, J. E.; SILVA, J. S.; ROCHA, M. V. P. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **Catalysis Today**, v. 255, p. 33-40, 2015.
- ALMEIDA, M. M. B.; DE SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, Â. M. C.; PRADO, G. M.; MAGALHÃES, E. C.; MAIA, G. A.; LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155-2159, 2011.
- ALVES, J. E.; FREITAS, B. M. Requerimentos de polinização da goiabeira. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1281-1286, 2007.
- ANDRADE, R. A. M. S.; MACIEL, M. I. S.; SANTOS, A. M. P.; MELO, E. A. Optimization of the extraction process of polyphenols from cashew apple agro-industrial residues. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 354-360, 2015.
- ARAÚJO, K. L.; MAGNANI, M.; NASCIMENTO, J. A.; SOUZA, A. L.; EPAMINONDAS, P. S.; SOUZA, A. G.; QUEIROZ, N. Antioxidant activity of co-products from guava, mango and barbados cherry produced in the Brazilian Northeast. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3110-3119, 2014.
- AYALA-ZAVALA, J. F.; VEGA-VEGA, V.; ROSAS-DOMINGUEZ, C.; PALAFOX-CARLOS, H.; VILLA-RODRIGUEZ, J. A.; SIDDIQUI, M. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1866-1874, 2011.
- ASYIFAH, M. R.; LU, K.; TING, H. L.; ZHANG, D. Hidden potential of tropical fruit waste components as a useful source of remedy for obesity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 62, n. 16, p. 3505-3516, 2014.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BALL, S.; BULLOCK, S.; LLOYD, L.; MAPP, K.; EWEN, A. Analysis of carbohydrates, alcohols, and organic acids by ion-exchange chromatography. In *Agilent Hi-Plex Columns Applications Compendium*, **Agilent Technologies Inc.**, 2011.

BARBOSA, L. S.; MACEDO, J. L.; SANTOS, C. M.; MACHADO A. V. Estudo da Secagem de Frutos Tropicais do Nordeste: Study of the drying of tropical fruits Northeast. **Revista Verde**, v. 9, n.1, p.186-190, 2014.

BARRETO, G. P. DE M.; SOUZA, A. C. R.; AZEREDO, H. M. C.; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos em sub-produtos da castanha de caju. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 2, p. 207-213, 2007.

BATISTA, K. S.; ALVES, A. F.; LIMA, M. D. S.; SILVA, L. A.; LINS, P. P.; GOMES, J. A. S.; SILVA, A. S.; TOSCANO, L. T.; MEIRELES, B. R. L. A.; CORDEIRO, A. M. T. M.; CONCEIÇÃO, M. L.; SOUZA, E. L.; AQUINO, J. S. Beneficial effects of consumption of acerola, cashew or guava processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. **British Journal of Nutrition**, v. 119, p. 30-41, 2018.

BAUTISTA-GALLEGO, J.; ARROYO-LÓPEZ, F. N.; RANTSIOU, K.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.; COCOLIN, L. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. **Food Research International**, v. 50, p. 135-142, 2013.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Brasília: ANVISA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em: Set. 2016.

CAETANO, P. K.; DAIUTO, É. R.; VIEITES, R. L. Característica físico-química e sensorial de geleia elaborada com polpa e suco de acerola. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 3, p. 191-197, 2012.

CARR, M. K. V. The water relations and irrigation requirements of cashew (*Anacardium occidentale* L.): a review. **Experimental Agriculture**, v. 50, n. 1, p. 24–39, 2014.

CARRILLO, M. G.; FERRARIO, M.; GUERRERO, S. Effect iveness of UV-C light assisted by mild heat on *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 inactivation in carrot-orange juice blend studied by flow cytometry and transmission electron microscopy. **Food Microbiology**, v. 73, p.1-10, 2018.

CARVALHO, A. S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F. X.; GIBBS, P. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 248-254, 2004.

CAVICHOLI, J. C.; GARCIA, M. J. M.; BRIDA, A. L.; WILCKEN, S. R. S. Reaction in barbados cherry (*Malpighia emarginata* D.C.) to *Meloidogyne enterolobii*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 156-160, 2014.

CIANCI, F. C.; SILVA, L. F. M.; CABRAL, L. M. C.; MATTA, V. M. Clarificação e concentração de suco de caju por processos com membranas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 579-583, 2005.

CROW, J. H., CARPENTER, J. F., CROWE, L. M. The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, n. 60, p. 73-103, 1973.

CORRADINI, C.; LANTANO, C.; CAVAZZA, A. Innovative analytical tools to characterize prebiotic carbohydrates of functional food interest. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 13, p. 4591-4605, 2013.

COSTA, J. M. C. da.; FELIPE, E. M. de F.; MAIA, G. A.; HERNANDEZ, F. F. F.; BRASIL, I. M. Production and characterization of the Cashew Apple (*ANACARDIUM OCCIDENTALE* L.) and Guava (*PSIDIUM GUAJAVA* L.) fruit powders. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 33, n. 1, p. 299-312, 2009.

DENG, G. F.; SHEN, C.; XU, X. R.; KUANG, R. D.; GUO, Y. J.; ZENG, L. S.; GAO, L. L.; LIN, X.; XIE, J. F.; XIA, E. Q.; LI, SHA.; WU, S.; CHEN, F.; LING.; W. H.; LI, H. B. Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 13 n. 7, p. 8308-8323, 2012.

DIANAWATI, D.; MISHRA, V.; SHAH, N. P. Stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* during storage at room temperature at low aw. **Food Research International**, v. 50, p. 259-265, 2013.

DOS SANTOS, K. M. O.; DE OLIVEIRA, I. C.; LOPES, M. A. C.; CRUZ, A. P. G.; BURITI, F. C. A.; CABRAL, L. M. Addition of grape pomace extract to probiotic fermented goat milk: the effect on phenolic content, probiotic viability and sensory acceptability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 4, p. 1108-1115, 2016.

DUARTE, F. N. D.; RODRIGUES, J. B. ; LIMA, M. C.; LIMA, M. S.; PACHECO, M. T. B.; PINTADO, M. M. E.; AQUINO, J. S.; SOUZA, E. L. Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on *Lactobacillus* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 3712-3719, 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Scientific Opinion. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. **EFSA Journal**, v.10, p. 2740, 2012.

FAO WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report, 1e11, 2002.

FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND. Probiotic Health Claims. Food Safety Authority of Ireland. 2013. Disponível em: [http://www.fsai.ie/faqs/probiotic\\_health\\_claims.html](http://www.fsai.ie/faqs/probiotic_health_claims.html). Acesso em: Jul. 2018.

FURLANETO, F. de P.; NASSER, M. D. PANORAMA DA CULTURA DA ACEROLA NO ESTADO DE SÃO PAULO. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2015.

GARCIA, E. F.; LUCIANO, W. A.; XAVIER, D. E.; COSTA, W. C. A.; OLIVEIRA, K. S.; FRANCO, O. L.; MORAIS JÚNIOR, M. A.; LUCENA, B. T. L.; PICÃO, R. C.; MAGNANI, M.; SAARELA, M.; SOUZA, E. L. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1371, p. 1-11, 2016.

GARRUTI, D. S.; FRANCO, M. R. B.; DA SILVA, M. A. A. P.; JANZANTTI, N. S.; ALVES, G. L. Evaluation of volatile flavour compounds from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice by the Osme gas chromatography/olfactometry technique. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 83, n. 14, p. 1455-1462, 2003.

GEBARA, C.; RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GANDARA, A. L. N.; GIGANTE, M. L. Effectiveness of different methodologies for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* La5 from yoghurt and Prato cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 508-513, 2015.

GOLOWCZYC, M.; VERA, C.; SANTOS, M.; GUERRERO, C.; CARASI, P.; ILLANES, A.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A.; TYMCZYSZYN, E. Use of whey permeate containing *insitu* synthesized galacto- oligosaccharides for the grow thand preservation of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Dairy Research**, v. 80, n. 3, p. 374-381, 2013.

GONZALEZ-AGUIAR, G. A.; ROBLES-SÁNCHEZ, R. M.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A.; OLIVAS, G. I.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; ROSA, L. A. de la. Bioactive compounds in fruits: health benefits and effect of storage conditions. **Postharvest Stewart Review.**, v. 4, n. 3, p. 1-10, 2008.

GUERGOLETTI, K. B. ; MAGNANI, M.; MARTIN, J. S.; ANDRADE, C. G. T. J.; GARCIA, S. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.11, p. 415-421, 2009.

GULLÓN, B.; GULLÓN, P.; TAVARIA, F.; PINTADO, M.; GOMES, A. M.; ALONSO, J. L.; PARAJO, J. C. Structural features and assessment of prebiotic activity of refined arabinoxylooligosaccharides from wheat bran. **Journal of Functional Foods**. v. 6, p. 438-449, 2014.

HAMMES, F.; BERNEY, M.; EGLI, T. Cultivation-independent assessment of bacterial viability. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 124, p. 123-150, 2011.

HEALTH CANADA. Accepted Claims about the Nature of Probiotic Microorganisms in Food. Health Canada. 2009. Disponível em: [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/labeling/claims-reclam/probiotics\\_claims-allegations\\_probiotiques-eng.php%20\(2009\)](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/labeling/claims-reclam/probiotics_claims-allegations_probiotiques-eng.php%20(2009)). Acesso em: Out. 2018.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 121-129, 2001.

HERVERT-HERNÁNDEZ, D.; GARCÍA, O. P.; ROSADO, J. L.; GOÑIA, I. The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1182-1189, 2011.



HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014.

INFANTE, J.; SELANI, M. M.; TOLEDO, N. M. V.; SILVEIRA-DINIZ, M. F.; ALENCAR, S. M.; SPOTO, M. H. F. Antioxidant activity of agroindustrial residues from tropical fruits. **Brazilian Journal of Food Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 87-91, 2013.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821-1835, 2011.

KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2003.

KIM, D. K.; KIM, S. J.; KANG, D. H. Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts. **Food Research International**, v. 97, p. 280-287, 2017.

KONG, K. W.; ISMAIL, A. Lycopene content and lipophilic antioxidant capacity of by-products from *Psidium guajava* fruits produced during puree production industry. **Food and Bioproducts Processing**, [S.I.], v. 89, n. 1, p. 53-61, 2011.

LEFFA, D. D.; SILVA, J.; DAUMANN, F.; DAJORI, A. L. F.; LONGARETTI, L. M.; DAMIANI, A. P.; LIRA, F.; CAMPOS, F.; FERRAZ, A. B. F.; CORREA, D. S.; ANDRADE, V. M. Corrective effects of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake on biochemical and genotoxic parameters in mice fed on a high-fat diet. **Mutation Research**, v. 770, p. 144-152, 2014.

LEMMENS, L.; VAN BUGGENHOUT, S.; OEY, I.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. Towards a better understanding of the relationship between the  $\beta$ -carotene in vitro bio-accessibility and pectin structural changes: A case study on carrots. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1323-1330, 2009.

LESLIE, S. B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied Environ Microbiology**, v. 61, p. 3592-3597, 1995.

LI, C.; NIE, S. P.; DING, Q.; ZHU, K. X.; WANG, Z. J.; XIONG, T.; XIE, M. Y. Cholesterol-lowering effect of *Lactobacillus plantarum* NCU116 in a hyperlipidaemic rat model. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 340-347, 2014.

LIU, M.; LI, X. Q.; WEBER, C.; LEE, C. Y.; BROWN, J.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2926-2930, 2002.

- MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SANTOS, PHM. Técnica aumenta tempo de conservação da goiaba. **Revista Ciência e Tecnologia-FUNCAP**, v. 4, n. 1, p. 11-12, 2002.
- MARQUES, L. G. **Liofilização de frutas tropicais**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química/Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- MARTINS, C. R; FARIAS, R. M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.9, n.1, p. 83-93, 2002.
- NÓBREGA, E. M.; OLIVEIRA, E. L.; GENOVESE, M. I.; CORREIA, R. T.P. The impact of hot air drying on the physical-chemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata*) residue. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 2, p. 131-141, 2015.
- NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A.; SILVA JÚNIOR, J. F. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 463-470, 2002.
- OLIVEIRA, A. C.; VALETIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BARROS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 469-475, 2009.
- OLIVEIRA, G.; GONZÁLEZ-MOLERO, I. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. **Endocrinología y Nutrición**, v. 824, p. 1-13, 2016.
- OLDENHOF, H., WOLKERS, W. F., FONSECA, F., PASSOT, S., MARIN, M. Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus bulgaricus*: an in situ Fourier transform infrared spectroscopy study. **Biotechnology Progress**, n. 21, p. 885-892, 2005.
- OZDAL, T.; SELA, D. A.; XIAO, J.; BOYACIOGLE, D.; CHEN, F.; CAPANOGLU, E. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 78, 2016.
- PADILHA, C. V. da S.; MISKINIS, G. A.; SOUZA, M. E. A. O. de; PEREIRA, G. E.; OLIVEIRA, D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; LIMA, M. S. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, v. 228, p.106-115, 2017.
- PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, p. 1276-1283, 2011.
- PINHO, L. X.; AFONSO, M. R. A.; CARIOCA, J. O. B.; COSTA, J. M. C.; RAMOS, A. M. The use of cashew apple residue as source of fiber in low fat hamburgers. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 941-945, 2011.

QUEIROZ, C.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Changes in bioactive compounds and antioxidant capacity of fresh-cut cashew apple. **Food Research International**. [S.I.]: v. 44, n. 5, p.1459-1462, 2011.

QUINTANDA, G.; GERBINO, E.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Okara: A nutritionally valuable by-product able to stabilize *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, spray-drying, and storage. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 641, 2017.

RIJKERS, G. T.; VOS, W. M.; BRUMMER, R. J.; MORELLI, L.; CORTIER, G.; MARTEAU, P. Health benefits and health claims of probiotics: bridging Science and marketing. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 1291-1296, 2011.

ROCKENBACH, I. I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L. V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M. I.; GONÇALVES, A. E. S. S.; FETT, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*vitis vinifera* L. and *vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 127, p. 174-179, 2011.

SAAD, S. M. I. Probiotics and prebiotics: the state of the art. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SAAD, N. A.; DELATTRE, B. M.; URDACI, C. J. M.; SCHMITTER, D. P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1-16, 2012.

SADRZADEH-YEGANEH, H.; ELMADFA, I.; DJAZAYERI, A.; JALALI, M.; HESHMAT, R.; CHAMARY, M. The effects of probiotic and conventional yoghurt on lipid profile in women. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 12, p. 1778-1783, 2010.

SANCHO, S. O.; SILVA, A. R. A.; DANTAS, A. N. S.; MAGALHÃES, T. A.; LOPES, G. S.; RODRIGUES, S.; COSTA, J. M. C.; FERNANDES, F. A. N.; SILVA, M. G. V. Characterization of the industrial residues of seven fruits and prospection of their potential application as food supplements. **Journal of Chemistry**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

SANTOS, C. E. dos; KIST, B. B.; CARVALHO C. de; REETZ, E. R.; DRUM, M. **Anuário brasileiro da fruticultura 2014**, Santa Cruz do Sul: Gazeta; Santa Cruz, 104 p. 2014.

Disponível em:

<[http://www.grupogaz.com.br/tratadas/eo\\_edicao/4/2014/03/20140325\\_3d8463877/pdf/4333\\_fruticultura\\_2014.pdf](http://www.grupogaz.com.br/tratadas/eo_edicao/4/2014/03/20140325_3d8463877/pdf/4333_fruticultura_2014.pdf)>. Acesso: Ago. 2018.

SARIBURUN, E.; SAHIN, S.; DEMIR, C.; TURKBEN, C.; UYLASER, V. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry cultivars. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 4, p. 328-335, 2010.

SCHENK, M.; RAFFELLINI, S.; GUERRERO, S.; BLANCO, G. A.; ALZAMORA, S.M. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyc escerevisiae* by UV-C light: study of cell injury by flow cytometry. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p.191-198, 2011.

SCHWAB, C.; VOGEL, R.; GANZLE, M. G. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. **Cryobiology**, v. 55, p. 108-114, 2007.

SERBAN, D. E. The gut microbiota in the metagenomics era: sometimes a friend, sometimes a foe, Roumanian. **Archives of Microbiology and Immunology**. v. 70, n. 3, p. 134-140, 2011.

SHU, S., GUO, S. R., SUN, J., YUAN, L.Y. Effects of salt stress on the structure and function of the photosynthetic apparatus in *Cucumis sativus* and its protection by exogenous putrescine. **Physiologia Plantarum**, v. 146, p. 285-296, 2012.

SILVA, L. M. R.; FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P.; FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, n. 1, p. 398-404, 2014.

SILVA, F.; FERREIRA, S.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C.; Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 1479-1486, 2011.

SOSA, N.; GERBINO, E.; GOLOWCZYC, M.; SCHEBOR, C.; CÓMEZ-ZAVAGLIA, A.; TYMCZYSZYN, E.E. Effect of galacto-oligosaccharides: maltodextrin matrices on the recovery of *Lactobacillus plantarum* after spray-drying. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 584, 2016.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M. Total phenolics and in vitro antioxidant capacity of tropical fruit pulp wastes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 202-210, 2011.

STRASSER, S.; NEUREITE, M.; GEPPL, M.; BRAUN, R.; DANNER, H. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 167-177, 2009.

SUCCI, M.; TREMONTE, P.; PANNELLA, G.; TIPALDI, L.; COZZOLINO, A.; COPPOLA, R.; SORRENTINO, E. Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static in vitro digestion model. **Journal of Functional Foods**, v.35, p. 60-67, 2017.

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/NEPA-UNICAMP. 4 ed., revisada e ampliada, Campinas: NEPAUNICAMP, 2011, 161 p.

TALASIL, U.; SHAIK, K. B. Quality, spoilage and preservation of cashew apple juice: A review. **Journal of Food Science Technology**, v. 52, n. 1, p. 54-62, 2015.

TARGINO PINTO, R.; SOUSA, B. A. de A. Biotechnological Reuse of Fruit Residues as a Rational Strategy for Agro-industrial Resources. **Journal of Technology Management & Innovation**, [S.I.], v. 5, n. 2, p. 104-112, 2010.

TAVERA-QUIROZ, M. J.; ROMANO, N.; MOBILI, P.; PINOTTI, A.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A.; BERTOLA, N. Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Functional Foods**, v.16, p.164-173, 2015.

TEIXEIRA, P.; CASTRO, H.; KIRBY, R. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 456-462, 1995.

THOMAZ, A. M. A. U. Avaliação das potencialidades biotecnológicas da semente de goiaba (*Psidium guajava* L.). 2014. 225 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

TRACY, B. P.; GAIDA, S. M.; PAPOUTSAKIS, E. T. Flow cytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 85-99, 2010.

TREICHEL, M.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E. dos; CARVALHO de, BELING, R. R. **Anuário brasileiro da fruticultura 2016**, Santa Cruz do Sul: editora Gazeta; Santa Cruz, 88 p. 2016. Disponível em:<[http://www.grupogaz.com.br/tratadas/eo\\_edicao/4/2016/04/20160414\\_0d40a2e2a/pdf/5149\\_2016fruticultura.pdf](http://www.grupogaz.com.br/tratadas/eo_edicao/4/2016/04/20160414_0d40a2e2a/pdf/5149_2016fruticultura.pdf)>. Acesso: Ago. 2018.

TUOHY, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W.; GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 15, p. 692-700, 2003.

TYMCZYSZYN, E. E.; DÍAZ, M. R.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A.; DISALVO, E. A. Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. **Journal of Applied Microbiology**, n. 103, p. 2410–2419, 2007.

TYMCZYSZYN, E. E.; DÍAZ, M. R.; PATARO, A.; SANDONATO, N., GÓMEZ-ZAVAGLIA, A.; DISALVO, E. A. Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. **International Journal of Food Microbiology**, n. 128, p. 342–347, 2008.

TYMCZYSZYN, E. E.; SOSA, N.; GERBINO, E.; HUGO, A.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A.; SCHEBOR, C. Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 217-221, 2012.

TYMCZYSZYN, E. E.; GERBINO, E.; ILLANES, A.; GOMEZ-ZAVAGLIA, A. Galacto-oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Cryobiology**, n. 62, p. 123-129, 2011.

UCHOA, A. M. A.; COSTA, J. M. C.; MAIA, G. A.; MEIRA, T. R.; SOUSA, P. H. M.; BRASIL, I. M. Formulation and physicochemical and sensorial evaluation of biscuit-type cookies supplemented with fruit powders. **Plant Foods for Human Nutrition**, [S.I.], v. 64, n. 2, p. 153-159, 2009.

UCHOA, A. M. A.; COSTA, J. M. C.; MAIA, G. A.; SILVA, E. M. C.; CARVALHO, A. F. F. U.; MEIRA, T. R. Parâmetros físico-químicos: teor de fibra bruta e alimentar de pós alimentícios obtidos de resíduos de frutas tropicais. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 15, n. 2, p. 58-65, 2008.

UCHÔA-THOMAZ, A. M. A.; SOUSA, E. C.; CARIOCA, J. O. B.; MORAIS, S. M. DE; LIMA, A. DE; MARTINS, C. G.; ALEXANDRINO, C. D.; FERREIRA, P. A. T.; RODRIGUES, A. L. M.; RODRIGUES, S. P., THOMAZ, J. C. DE A.; SILVA, J. do N.; RODRIGUES, L. L. Chemical composition, fatty acid profile and bioactive compounds of guava seeds (*Psidium guajava* L.). **Food Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 485-492, 2014.

ZANATTA, C. L.; ZOTARELLI, M. F.; CLEMENTE, E. Peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 705-708, 2006.

ZHANG, X. L.; WU, Y. F.; WANG, Y. S.; WANG, X. Z.; PIAO, C. H.; LIU, J. M.; LIU, Y. L.; WANG, Y. H. The protective effects of probiotic-fermented soymilk on high-fat diet-induced hyperlipidemia and liver injury. **Journal of Functional Foods**, v. 30, p. 220-227, 2017.

ZHAN, Y.; XU, Q.; YANG, M. M.; YANG, H. T.; LIU, H. X.; WANG, Y. P.; GUO, J. H. Screening of freeze dried protective agents for the formulation of biocontrol strains, *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 and *Pantoea agglomerans* 2Re40. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 10-17, 2012.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

WEBB, G. P. Dietary supplements & functional foods. **John Wiley & Sons**, 2011.

## APÊNDICE

## ARTIGO

**Protective effects of tropical fruit processing co-products on probiotic *Lactobacillus* strains after freeze-drying and storage**

**Running title:** Protective effects of fruit co-products on lactobacilli

Artigo submetido ao periódico International Journal of Food Microbiology

**Abstract**

This study evaluated the protective effects of co-products from processing of tropical fruits acerola (*Malpighia glabra* L.), cashew (*Anacardium occidentale* L.) and guava (*Psidium guayaba* L.) on the probiotics *Lactobacillus paracasei* L-10, *L. casei* L-26 and *L. acidophilus* LA-05 after freeze-drying during storage. Viable counts of the *Lactobacillus* strains were measured before and after freeze-drying with and without the tested fruit co-products. The occurrence of damage to membrane integrity, membrane potential and efflux activity of *Lactobacillus* was evaluated by flow cytometry (FC), and the viable counts of these freeze-dried strains were measured during 90 days of storage under refrigeration and room temperatures. The freeze-drying caused a decrease in viable counts of all tested *Lactobacillus* strains, with the greatest reductions (approximately 2.9 log CFU mL<sup>-1</sup>) being observed for *L. casei* L-26 freeze-dried without fruit co-products. The viable counts after 48 h of freeze-drying were higher when the probiotics were freeze-dried with fruit co-products (7.4 - 8.9 log CFU mL<sup>-1</sup>) when compared to the freeze-drying without fruit co-products or with fructo-oligosaccharides. FC results demonstrated small cell subpopulations with damaged membrane integrity and efflux activity when the strains were freeze-dried with fruit co-products. *Lactobacillus* strains freeze-dried with fruit co-products maintained viable counts (approximately 2.6-5.3 log CFU mL<sup>-1</sup>) after 90 days of storage under room or refrigeration



temperature; these counts were higher than those observed when the strains were freeze-dried without fruit co-products ( $1 - 4 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ). The greatest protective effects on freeze-dried strains were overall presented by acerola co-product. These results show the potential of the agro-industrial co-products of acerola, cashew and guava as protective substrates for use in the freeze-drying of probiotic *Lactobacillus* strains.

**Keywords:** Fruit. Agro-industrial coproducts. Preservation. Cryoprotectants. *Lactobacillus* spp. Cell damage.

## 1. Introduction

The consumption of fruits has increased worldwide due to the recognition of their nutritional value and as sources of compounds with bioactive properties related to health promotion (Gonzalez-Aguilar et al., 2008; Gonzalez-Aguilar et al., 2010). Brazil has a great diversity of fruits, being considered the world third largest producer of fresh and processed fruits, following China and India (Alamar et al., 2016). Brazil also particularly stands out in the production of tropical fruits, being the world leader in acerola (*Malpighia glabra* L.), cashew (*Anacardium occidentale* L.) and guava (*Psidium guayaba* L.) production, which are fruits valued for their nutritional characteristics and good sensory acceptance (Abreu et al., 2013; Silva et al., 2014).

Due to their high degree of perishability, most of the fruits production in Brazil is destined for juices and frozen pulps processing industries (Ayala-Zavala et al., 2011; Infante et al., 2013). It is estimated that 30 to 40% of fruit dry weight processed for juice and pulp production is discarded as agro-industrial co-products (Araújo et al., 2014), which are commonly accumulated in large volumes at inadequate locations, representing potential environmental contamination problems (Ajila et al., 2007; Araújo et al., 2014; Nóbrega et al., 2015). These fruit processing co-products consist mainly of peels, seeds, bagasse, stalks and

other parts of the fruit, which (like their edible parts) are considered sources of bioactive compounds, vitamins and minerals (Ayala-Zavala et al., 2011; Batista et al., 2018; Duarte et al., 2017; Gorinstein et al., 2011).

Lactic acid bacteria (LAB) are important biotechnological tools for various industry sectors, being widely used as starter cultures for food and probiotic manufacturing. Among LAB, the *Lactobacillus* genus has been intensively studied for the selection of probiotic species and strains (Argyri et al., 2013; Sun et al., 2015). The health benefits derived from probiotics ingestion can generally be achieved when at least 6-7 log CFU of viable microorganisms per gram or milliliters of the carrier product are ingested (Aquilina et al., 2013; Tripathi and Giri, 2014; Hill et al., 2014). Probiotic cultures are typically freeze-dried to produce powders with prolonged storage stabilities (Romano et al., 2016; Garcia et al., 2018).

Lyophilization (freeze-drying) is one of the most widely used processes for the preservation of probiotic cultures (Fonseca et al., 2015; Morgan et al., 2006; Romano et al., 2016). However, the dehydration involved in the freeze-drying process can cause structural damage (particularly during freezing) in bacterial cells, resulting in decreased viability and metabolic activity (Carvalho et al., 2004; Leslie et al., 1995; Tymczyszyn et al., 2007; Tymczyszyn et al., 2008).

To avoid or decrease the occurrence of damages in bacterial cells, different ingredients such as skim milk, amino acids, glycerol, sugars (e.g., glucose, fructose, sorbitol, mannitol, trehalose, lactose and sucrose), dietary fibers, including those with prebiotic properties (e.g., fructo-oligosaccharides, inulin and raffinose), are generally incorporated into probiotic cultures submitted to dehydration processes. In such processes, these ingredients may act protecting the bacterial cultures, mainly due to the disturbing effects exerted by dehydration

on bacterial cell membrane (Chotiko and Sathivel, 2014; Golowczyc et al., 2011; Li et al., 2011; Nunes et al., 2018; Romano et al., 2015; Tymczyszyn et al., 2011).

Considering that fruits and their agro-industrial co-products are sources of simple sugars and non-digestible oligosaccharides, such as fructo-oligosaccharides, as well as of phenolic compounds with antioxidant activities (Ayala-Zavala et al., 2011; Batista et al., 2018; Duarte et al., 2017; Sancho et al., 2015), it could be expected that these co-products could have potential to act as protectants of probiotic cultures when subjected to dehydration processes, such as freeze-drying.

This study evaluated whether co-products generated during the processing of acerola, cashew and guava may exert protective effects toward different probiotic *Lactobacillus* strains during freeze-drying, as well as during storage.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Preparation of fruit processing co-products

The co-products of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), cashew (*Anacardium occidentale* L.) and guava (*Psidium guayaba* L.) were obtained from a frozen fruit pulp processing company located in the city of João Pessoa (Paraíba, Brazil). These co-products mainly consisted of peels, seeds and some mashed flesh. The samples were collected from several fruit processing batches, totaling approximately 6 kg for each fruit species. The material was frozen at a temperature of -18 °C using a benchtop freeze dryer (LI-101 model; LIOTOP®, São Carlos, Brazil) at a temperature of  $-55 \pm 2$  °C, with vacuum pressure < 138 µHG and a freeze-drying rate of 1 mm/h for approximately 12 h. The freeze-dried material was grounded using a domestic blender (low speed for 10 min) and sieved through a fine mesh to obtain a powder of mean particle size <1.0 mm. The final product (powder) was stored at -18 °C in rolled polypropylene bags up the tests were performed.

## 2.2 Physicochemical characterization of fruit processing co-products

The content of sugars (glucose, fructose and maltose) and the phenolic compounds profile were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) on an AGILENT chromatograph (Infinity LC model 1260, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using previously described analytical conditions (Ball et al., 2011; Dutra et al., 2018; Padilha et al., 2017). The extract of the co-products was initially obtained according to previously described procedures for determining the total phenolic compounds and total flavonoids (Sousa and Vieira, 2011). Then, the total phenolic and total flavonoid content was determined according to the methods proposed by Liu et al. (2002) and Zhishen et al. (1999), respectively, in a spectrophotometer (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brazil) with absorbance reading at 765 nm and 510 nm, respectively. In addition, the *in vitro* antioxidant activity of fruit co-products was assessed by an iron reduction method (Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP) in a spectrophotometer with absorbance reading at 593 nm, using the procedures described by Benzie and Strain (1996) adapted by Rockenbach et al. (2011); and by the ABTS method with absorbance reading in a spectrophotometer at 734 nm, following the procedure described by Sariburun et al. (2010). The values of the measured physicochemical parameters of acerola, cashew and guava processing co-products are presented in Table 1.

## 2.3 Assays to evaluate the protective effects of fruit co-products on freeze-dried *Lactobacillus* strains

### 2.3.1 Microorganisms, inoculum preparation and treatments

Different well-known probiotic *Lactobacillus* strains, namely *L. acidophilus* LA-05, *L. paracasei* L-10 and *L. casei* L-26 (Duarte et al., 2017; Nunes et al., 2018; Sousa et al., 2015), were used in the present study. These strains were obtained from the Collection of

Microorganisms, Faculty of Biotechnology, Catholic University of Porto (Porto, Portugal). Stock cultures were maintained in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS; HiMedia, Mumbai, India) broth containing glycerol ( $150 \text{ g L}^{-1}$ ) at a temperature of  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . For inocula preparation, the abovementioned test strains were firstly anaerobically cultured (Anaerogen System Anaerogen, Oxoid) in MRS broth at  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  up to reaching the stationary growth phase (20 - 24 h of incubation). Cell mass was collected by centrifugation ( $4000 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ ,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), washed twice in sterile saline ( $\text{NaCl } 8.5 \text{ g L}^{-1}$ ) and resuspended in five different treatments for each test *Lactobacillus* strain, namely: i) strain suspended in sterile distilled water (negative control, denominated NEC); ii) strain suspended in sterile distilled water with fructo-oligosaccharides (2% w/v, positive control, termed FOS); and iii) three different suspensions of each strain in sterile distilled water with 2% (w/v) of acerola (ACE), cashew (CAS) or guava (GUA) co-product (final pH ranging from 3.24 - 5.12). These suspensions provided viable counts of approximately  $10 \log \text{ CFU mL}^{-1}$  (with optical density (OD) reading at 625 nm (OD<sub>625</sub>) corresponding to 1.5). The suspensions were then transferred to capped glass vials (5 mL) under aseptic conditions and subjected to freezing at  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 hours.

### 2.3.2 Freeze-drying of probiotic *Lactobacillus* strains

The frozen bacterial suspensions containing the respective fruit co-products as well as the frozen positive and negative controls were subjected to the freeze-drying at a temperature of  $-55 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , with vacuum pressure  $<138 \text{ } \mu\text{HG}$ , freeze-drying rate of  $1 \text{ mm/h}$ , for approximately 40 h using a benchtop freeze dryer (LIOTOP<sup>®</sup>, Model L-101, São Carlos-SP, Brazil).

### 2.3.3 Enumeration of viable cells of probiotic *Lactobacillus* strains after freeze-drying

In order to evaluate the effects of freeze-drying on the viable cell counts of the tested *Lactobacillus* strains in the absence (CNE) or presence of the different substrates (FOS, ACE, CAS and GUA), the viable cells of the tested strains before (time 0, just after freeze-drying) and at different time intervals after freeze-drying (at times 0 - immediately after freeze-drying, 6, 12, 24 and 48 h) were counted. For this, the freeze-dried strains in the different treatments were rehydrated in sterile distilled water ( $30 \pm 0.5$  °C) for 15 min. Serial dilutions were subsequently performed using in sterile saline ( $\text{NaCl } 8.5 \text{ g L}^{-1}$ ) and dispensed onto MRS agar plates (HiMedia, Mumbai, India) using the MicroDrop inoculation technique (Herigstad et al., 2001). Plates were incubated anaerobically (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) at 37 °C for 48 h, and the viable count results were expressed as log CFU mL<sup>-1</sup>.

#### 2.3.4 Evaluation of damage in probiotic *Lactobacillus* cells after freeze-drying

Flow cytometry (FC) analysis was used to monitor the occurrence of cell damage in *Lactobacillus* strains tested in the absence (CNE) or presence of FOS, ACE, CAS or GUA after the freeze-drying process. Initially, the freeze-dried strains in the different treatments were rehydrated in sterile distilled water ( $30 \pm 0.5$  °C) for 15 min, and then filtered individually through a 0.45 µm membrane. The samples were centrifuged ( $4500 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ , 4 °C) and the obtained pellets were washed twice and resuspended in sterile phosphate buffered saline (PBS;  $\text{NaCl } 8.0 \text{ g/L}$ ;  $\text{KCl } 0.20 \text{ g/L}$ ;  $1.44 \text{ g/L de Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $0.24 \text{ g/L of KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7.4) and immediately labeled with propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to evaluate membrane integrity; trimetine oxonol of bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) [(DiBAC<sub>4</sub>(3) or BOX], Molecular Probes, Invitrogen, OR, USA] to verify changes in membrane potential; and ethidium bromide (EB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to evaluate efflux activity (Carrillo et al., 2018; Kim et al., 2017; Silva et al., 2011).

##### 2.3.4.1 Membrane integrity and potential

The cell pellets suspended in PBS were incubated in the presence of PI (1  $\mu\text{g/mL}$ ) and DiBAC<sub>4</sub>(3) (1  $\mu\text{g/mL}$ ) under the light for 10 and 30 min, respectively, at 37 °C. After the staining period, the samples were centrifuged (4500 g x for 10 min, 4 °C) and washed with equal volume of PBS to remove excess dye. The cell pellets were resuspended in PBS and analyzed on a flow cytometer (Kim et al., 2017).

#### 2.3.4.2 *Efflux activity*

The cell pellets suspended in PBS with 1% (w/v) glucose were incubated in the presence of EB (5  $\mu\text{g/mL}$ ) for 5 min at 37 °C with protection from light exposure. The samples were centrifuged (4500 g x 10 min, 4 °C) and washed with PBS. The cell pellets were then resuspended in PBS and analyzed on a flow cytometer (Silva et al., 2011).

#### 2.3.4.3 *FC analysis*

FC measurements were performed using flow cytometer equipped with an argon ion laser at 488 nm (BD Accuri C6, New Jersey, USA). Green and red fluorescence were collected on FL1 (533 nm  $\pm$  30 nm) and FL3 channels ( $>$  670 nm), respectively. Dispersion and fluorescence signals from individual cells passing through the laser zone were collected as logarithmic signals. The fluorescence signal (pulse area measurements) was collected by FL1 (DiBAC<sub>4</sub>(3)) and FL3 band filters (PI and EB). The threshold level for data acquisition was defined for FSC (12000) in order to eliminate the background and signs of debris considered to be much smaller than the intact bacterium. Bacteria cells were identified by FSC/SSC parameters. Each sample acquisition was operated at low flow rate and a total of 10,000 events were analyzed. All fluorescence emission cytograms were recorded using BD Accuri C6 Software (BD<sup>®</sup>, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

SSC density plot analysis versus FL1 or FL3 was applied to determine the fluorescence properties of the PI<sup>+</sup>, DiBAC<sub>4</sub>(3)<sup>+</sup> and EB<sup>+</sup> populations, respectively, indicating cells with membrane damage, depolarized membrane and altered efflux pump, respectively, which had their populations identified through rectangles located on the right side of the graphs.

#### *2.3.5 Evaluating the viability of test strains during storage*

The freeze-dried strains (counts of approximately 7-10 log CFU g<sup>-1</sup>) in the absence (CNE) or presence of the different substrates (FOS, ACE, CAS and GUA) were stored in vials, which were packed in desiccators containing silica gel for relative humidity control and stored under refrigeration ( $4 \pm 0.5$  °C) and room temperature ( $25 \pm 0.5$  °C) for 90 days. At regular storage time intervals of 15 days, the strains freeze-dried without or with substrates were rehydrated in sterile distilled water at room temperature ( $25 \pm 0.5$  °C), serially diluted using in sterile saline (NaCl 8.5 g L<sup>-1</sup>) and inoculated onto MRS agar plates using the MicroDrop inoculation technique (Herigstad et al., 2001). After an incubation period of 48 h at 37 °C under anaerobic conditions (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid), the visible colonies were counted and the results expressed as log CFU mL<sup>-1</sup>.

The detection limit of the assays for viable cell counts was 1 log CFU mL<sup>-1</sup>.

#### *2.4 Statistical analyses*

All analyses were performed in duplicate in two independent experiments and the results were expressed as means  $\pm$  standard deviations. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey test using  $p \leq 0.05$ . The Graphpad Prism 6.0 computational software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used to perform statistical analyses.



### 3. Results and discussion

#### 3.1 Viable counts of probiotic *Lactobacillus* strains after freeze-drying

The viable counts of *L. paracasei* L-10, *L. casei* L-26 and *L. acidophilus* LA-05 freeze-dried without (CNE) and with tested substrates separately (FOS, ACE, CAS or GUA) during 48 h are presented in Fig. 1. The suspensions of the tested *Lactobacillus* strains without or with the substrates had viable counts of approximately  $10 \log \text{CFU mL}^{-1}$  prior to the lyophilization. Just after the freeze-drying, the viable counts of all tested *Lactobacillus* strains freeze-dried without and with the substrates decreased; however, the greatest decreases were observed when the strains were freeze-dried without substrate (CNE), especially *L. casei* L-26 that presented count reductions of approximately  $2.9 \pm 0.2 \log \text{CFU mL}^{-1}$ .

A little decrease ( $p \leq 0.05$ ) or maintenance ( $p > 0.05$ ) of the viable counts of the tested *Lactobacillus* strains was observed after 48 h of lyophilization, especially when the strains were freeze-dried with ACE, CAS or GUA. After 48 h of lyophilization, *L. paracasei* L-10 (Fig. 1A) and *L. acidophilus* LA-05 (Fig. 1C) freeze-dried without substrate (CNE) showed a greater decrease in viable counts (reductions of approximately  $1.9 \pm 0.2$  and  $2.0 \pm 0.3 \log \text{CFU mL}^{-1}$ , respectively) when compared to the counts observed when the strain was freeze-dried with ACE, CAS or GUA (reductions  $< 1 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ). These results demonstrate that a higher population of viable cells of tested probiotic *Lactobacillus* strains were maintained when they were freeze-dried with any of the tested fruit co-products, standing out the protective effects exerted by ACE on *L. acidophilus* LA-05 (Fig. 1C) that presented the higher counts (approximately  $8.9 \pm 0.3 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) after 48 h. Similar viable counts ( $p > 0.05$ ) were observed for *L. casei* L-26 freeze-dried with ACE or FOS (approximately  $8 \pm 0.2 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) (Fig. 1B). These results are noteworthy because FOS has been used by as a cryoprotectant ingredient during the production of dehydrated LAB cultures used in food formulation (Moayyedi et al., 2018; Romano et al., 2016).

Monosaccharides (*e.g.*, fructose and glucose) normally have low glass transition temperature (T<sub>g</sub>) and exert a more efficient protecting effect on bacteria during freeze-drying, since they are capable of interacting with lipids of bacterial membranes and replacing water molecules (Crowe et al., 1992; Crowe et al., 1998). Polysaccharides (*e.g.*, maltodextrin and starch) or oligosaccharides (*e.g.*, fructo-oligosaccharides), which exhibit high T<sub>g</sub>, are usually less effective than monosaccharides to protect bacterial cells during freeze-drying; however, because polysaccharides can favor the formation of vitreous states, they may also exert some protection on bacterial cells during storage (Romano et al., 2016).

The results obtained in this study suggest that the ACE, CAS and GUA processing co-products could act as cryoprotectants with similar or even superior efficacy when compared to FOS, decreasing potential negative impacts in a short-time after freeze-drying on cell viability of probiotic *Lactobacillus* strains. The establishment of these effects could be mostly possibly related to the high contents of monosaccharides naturally present in the tested fruit co-products, such as fructose and glucose (Table 1).

### 3.2 Evaluation of damage in probiotic *Lactobacillus* cells after freeze-drying

The probiotic *Lactobacillus* strains freeze-dried without (CNE) or with the substrates tested (FOS, ACE, CAS or GUA) were analyzed by FC using three fluorescent probes (PI, EB, DIBAC<sub>4</sub>(3)) separately to verify if the fruit co-products may decrease the damage commonly caused by freeze-drying to bacterial membrane.

PI is the most commonly used dye in cytometric studies to evaluate the membrane integrity of bacterial cells. PI only penetrates the permeabilized cytoplasmic membranes (*i.e.*, only in cells with damaged membrane) and binds to nucleic acids (DNA, RNA or both) (Léonard et al., 2016; Tracy et al., 2010). The fluorescence density plots of *L. paracasei* L-10 (Fig. 2A-E) demonstrated that there was no evident change in the membrane integrity of this

strain when freeze-dried without or with the different tested substrates (only 0.1% subpopulation with damage when freeze-dried with ACE or CAS). Similarly, a small subpopulation of *L. casei* L-26 cells (<1%) (Fig. 3A-E) with damaged membrane integrity was observed regardless the use of substrates during freeze-drying. No damage in membrane integrity was observed in cells of *L. acidophilus* LA-05 (Fig. 4A-E) freeze-dried without substrate (CNE) or with FOS. Although subpopulations of cells with damaged membrane integrity were observed for *L. acidophilus* LA-05 freeze-dried with ACE, CAS or GUA, the sizes of these subpopulations were always very small (1-2.3%).

EB is a membrane permeant compound capable of penetrating intact cell membranes, being actively pumped out of the cell by a non-specific proton “antiport” transport system (Kim, Kim, & Kang, 2017). The fluorescence density plots of *L. paracasei* L-10 cells (Fig. 2F-J) showed no occurrence of damage in membrane efflux activity when this strain was freeze-dried without or with the different tested substrates. Among the three tested strains, *L. casei* L-26 (Fig. 3F-J) showed the smallest subpopulations of cells with damaged efflux activity when freeze-dried without (1%) or with ACE, CAS, GUA or FOS (0.6-1.5%). *L. acidophilus* LA-05 (Fig. 4F-J) was the strain with the highest cell subpopulations with damaged efflux activity when freeze-dried without or with any of the tested substrates. However, the subpopulations of *L. acidophilus* LA-05 cells with damaged efflux activity were smaller when this strain was freeze-dried with ACE, CAS or GUA (40.5-61.3%) when compared to the freeze-drying without substrate (CNE, 99.7%) or with FOS (99.8%).

The membrane potential is generated due to differences in ions content inside and outside the cell (Comas-Riu and Rius, 2009). DiBAC<sub>4</sub>(3) or BOXP is a fluorescent anionic dye capable of indicating changes in membrane potential (depolarization) of bacterial cells after exposure to antimicrobial treatments or stressing conditions (Grau-Campistany et al., 2016). Higher subpopulations of *L. paracasei* L-10 cells with membrane depolarization (Fig. 2K-O)

were observed when the strain was freeze-dried without substrate (CNE, 98.1%) as well as with FOS (99.6%) when compared to the freeze-drying with ACE (56.2%), CAS (18.4%) or GUA (38.3%). Subpopulations of *L. paracasei* L-10 cells with depolarized membranes were observed when this strain was freeze-dried with ACE (56.2%), CAS (18.4%) or GUA (38.3%). Smallest subpopulations of *L. casei* L-26 cells with depolarized membranes were also observed when this strain was freeze-dried with ACE (36.7%), CAS (35.4%) and GUA (48.7%) when compared to freeze-drying without substrate (CNE, 99.7%) or with FOS (96.85%) (Fig. 3K-O). Similarly, the lowest subpopulations of *L. acidophilus* LA-05 cells (Fig. 4K-O) with depolarized membrane were observed after freeze-drying with ACE (22.0%), CAS (10.8%) and GUA (7.1 %), followed by freeze-drying with FOS (30.9%).

The flow cytometric analysis results showed that the freeze-drying with ACE, CSA or GUA co-products resulted overall in absence or low occurrence of cells with damage in the measured membrane functions of *L. paracasei* L-10 and *L. casei* L-26, mainly in relation to membrane integrity and efflux activity. Among the tested strains, *L. acidophilus* LA-05 presented the highest subpopulations with damaged membrane functions after freeze-drying with tested fruit co-products (Fig. 4). However, subpopulations of *L. acidophilus* LA-05 cells with altered membrane functions, mainly efflux activity and membrane potential, were smaller when this strain was freeze-dried with fruit co-products (Fig. 4F-J). Additionally, these data demonstrate that the protective effects exerted by ACE, CAS and GUA co-products could be strain-dependent.

Available literature reports that bacteria undergo cellular damage at all stages of the freeze-drying process (Ananta et al., 2004; Castro et al., 1997; Reid et al., 2007), being cited two main causes for such damages: i) alterations in the structure of sensitive proteins, causing loss of enzymatic and metabolic activities; and ii) alterations in the physical state of membrane lipids, impairing their integrity and fluidity (Balasubramanian et al., 2009;

Ragoonanan et al., 2010; Velly et al., 2015; Wolkers et al., 2007). Cryoprotectants are therefore used to reduce the losses in the viability of probiotic cells during lyophilization.

Cryoprotectants generally comprise polysaccharides, disaccharides (*e.g.*, trehalose, lactose and maltose), organic polymers, proteins (*e.g.*, casein and whey protein), amino acids, sugar alcohols or complex mixtures (*e.g.*, skim milk) (Dianawati et al., 2013; Sun et al., 2013). These compounds/substances can minimize alterations in the physical state of membrane lipids or reduce alterations in the structure of sensitive proteins in biological systems during lyophilization, thereby improving the maintenance of bacterial cell viability (Hubálek, 2003). Two possible mechanisms have been proposed to explain the protective effects of sugars on bacterial cells: (i) sugars can replace water molecules during dehydration and maintain biological structures under hydrated conditions (Crowe et al., 1992; Leslie et al., 1995; Santivarangkna et al., 2008); and ii) sugars can increase the viscosity of the medium and decrease molecular mobility due to their ability to form vitreous matrices (vitrification), decreasing the occurrence of molecular interactions (Tymcyszyn et al., 2011; Tymcyszyn et al., 2012). Smaller sugars are generally more efficient in protecting lipid membranes of LAB during freeze-drying when compared to larger sugars (*e.g.*, fructo-oligosaccharides) (Romano et al., 2016).

This information indicates that the physicochemical characteristics (Table 1) of fruit processing co-products (particularly of ACE and CAS) used as substrates during the freeze-drying of the tested *Lactobacillus* strains, which showed considerable amounts of sugars (*e.g.*, glucose, fructose and maltose), could enable these materials to protect cell membranes of these microorganisms, thereby decreasing the damage that typically occur during lyophilization. A previous study showed that ACE and CAS co-products had higher fiber contents, mainly soluble fibers (14.22 and 7.98 g 100 g<sup>-1</sup>, respectively), when compared to

GUA processing co-products ( $3.74 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) (Batista et al., 2018), reinforcing the greater protective effects exerted by ACE and CAS co-products on the tested *Lactobacillus* strains.

The bioactive compounds most commonly present in tropical fruits and, consequently, in their agro-industrial co-products (e.g., vitamin C and E, carotenoids, phenolic compounds and dietary fiber) (Gonzalez-Aguilar et al., 2008) have shown antioxidant and free radical sequestering properties, which can slow or inhibit the oxidation of DNA, proteins and lipids in cells (Ayala-Zavala et al., 2011). The high amounts of phenolic compounds and total flavonoids in the tested fruit co-products, mainly in ACE co-product, possibly contributed to its higher antioxidant activity (as observed in FRAP or ABTS assays, Table 1) when compared to CAS and GUA co-products). These characteristics may be associated with the greater protection on bacterial cell membranes when the tested *Lactobacillus* strains were freeze-dried with ACE co-product.

### 3.3 Viable counts of probiotic *Lactobacillus* strains during storage

The viable counts of freeze-dried *L. paracasei* L-10 (Fig 5A-B), *L. casei* L-26 (Fig 5C-D) and *L. acidophilus* LA-05 (Fig. 5E-F) were evaluated during 90 days of storage under refrigeration ( $4 \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and room ( $25 \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) temperatures. The freeze-dried tested *Lactobacillus* strains presented viable counts in the range of 3.2 to 10 log CFU  $\text{mL}^{-1}$  over the 90 days of storage under refrigeration temperature. The viable counts of tested *Lactobacillus* strains freeze-dried with ACE, CAS or GUA ( $4 \pm 0.1 - 5.3 \pm 0.2 \text{ log CFU mL}^{-1}$ ) after 90 days were higher ( $p \leq 0.05$ ) when stored under refrigeration temperature than under room temperature ( $2.6 \pm 0.1 - 4.9 \pm 0.2 \text{ log CFU mL}^{-1}$ ). However, the viable counts of tested *Lactobacillus* strains freeze-dried with ACE, CAS or GUA ( $2.6 \pm 0.3 - 4.9 \pm 0.2 \text{ log CFU mL}^{-1}$ ) at the end of the 90-days storage at room temperature were higher ( $p \leq 0.05$ ) than those

observed when these strains were freeze-dried without substrate (CNE,  $1 \pm 0.2 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) or with FOS ( $1 \pm 0.1 - 1.7 \pm 0.3 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ).

*L. paracasei* L-10 (Fig. 5A-B) freeze-dried without or with substrates showed sharp reductions in viable counts after 15 days of storage under refrigeration or room temperatures, especially when this strain was freeze-dried without substrate (CNE, reductions of approximately  $2.7 \pm 0.2$ ). The viable counts of *L. paracasei* L-10 decreased during the 90 days of storage under refrigeration temperature regardless the use of substrate during freeze-drying (Fig. 5A), but the highest decreases ( $>5 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) were observed when this strain was freeze-dried without substrate (CNE). The viable counts of *L. paracasei* L-10 after 90 of days storage under refrigeration temperature were higher ( $p \leq 0.05$ ) when this strain was freeze-dried with ACE ( $4.8 \pm 0.2 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) in comparison to the freeze-drying with CAS ( $4.2 \pm 0.2 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ), GUA ( $4 \pm 0.1 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) or FOS ( $4 \pm 0.2 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ); however, at this same storage time point, the viable counts of *L. paracasei* L-10 freeze-dried with ACE, CAJ or GOI were higher ( $p \leq 0.05$ ) when compared to the freeze-drying without substrate (CNE,  $3.5 \pm 0.2 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) or with FOS ( $3.7 \pm 0.1 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ).

A small decrease ( $<1 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) in viable counts of *L. casei* L-26 (Fig. 5C-D) was observed after 15 days of storage under refrigeration temperature when the strain was freeze-dried with ACE, CAS, GUA and FOS; at this same storage time point, *L. casei* L-26 freeze-dried without substrate (CNE) showed decrease in viable counts  $>1 \log \text{CFU mL}^{-1}$  (Fig. 5C). The viable counts of *L. casei* L-26 freeze-dried without and with substrates overall decreased from 15 days of storage under refrigeration onward. The viable counts of *L. casei* L-26 freeze-dried with ACE ( $5.3 \pm 0.3 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) were higher ( $p \leq 0.05$ ) than those observed when this strain was freeze-dried with CAS ( $4.2 \pm 0.2 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) or GOI ( $4 \pm 0.1 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) after 90 days of storage under refrigeration.

The viable counts of *L. acidophilus* LA-05 decreased ( $p \leq 0.05$ ) after 15 days of storage under refrigeration and room temperatures regardless the use of substrate during freeze-drying (Fig. 5E-F); however, the counts of this strain when freeze-dried with ACE or FOS did not change ( $p > 0.05$ ) from 15 to 45 days of storage under refrigeration. The viable counts of *L. acidophilus* LA-05 at the end of the 90-days refrigerated storage were higher when this strain was freeze-dried with ACE ( $4.7 \pm 0.2 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) in comparison with the freeze-drying with CAS ( $4 \pm 0.3 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ), GUA ( $4 \pm 0.2 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) and FOS ( $3.7 \pm 0.2 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) or without substrate (CNE) ( $3.2 \pm 0.1 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ).

Freeze-dried cultures can be stored at higher temperatures than those used in freezing, and refrigeration at 4 °C is considered adequate for this purpose (Champagne and Møllgaard, 2008). However, when stored under room temperature (i.e., 22 °C), the decreases in viable counts of dehydrated cultures may be up to 10-fold greater when compared to storage under refrigeration temperature (i.e., 4 °C) (Champagne et al., 1996). This behavior is associated with the difference between the storage temperature and glass transition temperature (T-T<sub>g</sub>), since the higher the T-T<sub>g</sub>, the greater the protection of dehydrated bacteria. Therefore, storage at lower temperatures, such as refrigeration (4 °C), is recommended (Santos et al., 2014a; Santos et al., 2014b; Sosa et al., 2016). This evidence reinforces the data observed in the present study, which showed a more pronounced drop in the number of viable cells of the tested *Lactobacillus* strains when stored under room temperature, revealing that storage of *Lactobacillus* strains freeze-dried with ACE, CAS or GUA processing co-products under refrigeration temperature (4 °C) could be the most appropriate.

However, it is important to emphasize that the storage of probiotic cultures under room temperature enabling high viable cell counts for application in food products is one of the objectives of food industry (Champagne et al., 2011). Although the reductions in viable cell counts of tested *Lactobacillus* strains throughout storage were higher at room



temperature, it was observed that such reductions were decreased when the strains were freeze-dried with ACE, CAS or GUA processing co-products, enhancing the potential of such materials to exert persistent protection on *Lactobacillus* strains throughout storage. However, further studies should be carried out to optimize the freeze-drying conditions of probiotic *Lactobacillus* in the presence of the tested fruit processing co-products (i.e., in combination with other cryoprotectants and variations in the length of freeze-drying period), as well as the storage conditions (mainly moisture) in order to measure their possible impacts on the observed protective effects.

#### **4. Conclusion**

The results of this study showed that the use of ACE, CAS and GUA agro-industrial co-products were able to exert protective effects on probiotic *Lactobacillus* strains when subjected to freeze-drying and prolonged storage under refrigeration and room temperatures. However, higher stability was observed when the *Lactobacillus* strains were freeze-dried with fruit processing co-products following stored under refrigeration temperature. Furthermore, strains lyophilized with ACE, CAS and GUA co-products presented lower cell membrane damage, especially when freeze-dried with ACE, indicating greater protection of bacterial cells from lesions caused by lyophilization. The presence of sugars, fibers and phenolic compounds in the tested tropical fruit co-products possibly influenced the recovery and/or maintenance of the viability of *Lactobacillus* cells after freeze-drying and during storage. These results show the potential of ACE, CAS and GUA processing co-products as protective substrates during freeze-drying of probiotic *Lactobacillus* strains used in the formulation of functional foods or for direct consumption as dietary supplements.

## 5. Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

Abreu, F.B., Dornier, M., Dionisio, A.P., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Dhuique-Mayer, C., 2013. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: a focus on carotenoids. *Food Chem*, 138, 25–31.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.028>

Ajila, C.M., Bhat, S. G., Rao, U.J.S.P., 2007. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chem*, 102, 1006–1011.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.036>

Alamar, P.D., Caramês, E.T.S., Poppi, R.J., Pallone, J.A.L., 2016. Quality evaluation of frozen guava and yellow passion fruit pulps by NIR spectroscopy and chemometrics. *Food Res Int*, 85, 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.027>

Ananta, E., Heinz, V., Knorr, D., 2004. Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. *Food Microbiol*, 21, 567–577.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.11.008>

Aquilina, G., Bach, A., Bampidis, V., Bastos, M.L., Flachowsky, G., Gralak, M.A., Hogstrand, C, Leng, L., López-Puente, S., Martelli, G., Mayo, B., Renshaw, D., Rychen, G., Saarela, M., Sejrsen, K., Beelen, P.V., Wallace, R.J., Westendorf, J., 2013. Scientific opinion

on the safety and efficacy of Probiotic LACTINA<sup>®</sup> (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus faecium*) for chickens for fattening and piglets. EFSA J, 11, 3170–3183.

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3170>

Araújo, K.L., Magnani, M., Nascimento, J.A., Souza, A.L., Epaminondas, P.S., Souza, A.G., Queiroz, N., 2014. Antioxidant activity of co-products from guava, mango and barbados cherry produced in the Brazilian Northeast. *Molecules*, 19, 3110–3119.

<https://doi.org/10.3390/molecules19033110>

Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.A., Tsakalidou, E., Nychas, G.J.E., Paganou, E.Z., Tassou, C.C., 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol*, 33, 282–291.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>

Ayala-Zavala, J.F., Vega-Vega, V., Rosas-Dominguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Siddiqui, M., 2011. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Res Int*, 44, 1866–1874.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021>

Balasubramanian, S.K., Wolkers, W.F., Bischof, J.C., 2009. Membrane hydration correlates to cellular biophysics during freezing in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1788, 945–953. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.02.009>

Ball, S., Bullock, S., Lloyd, L., Mapp, K.P., Ewen, A., 2011. Analysis of carbohydrates, alcohols, and organic acids by ion-exchange chromatography, in Agilent Hi-Plex Columns Applications Compendium. Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA.

Batista, K.S., Alves, A.F., Lima, M.D.S., Silva, L.A., Lins, P.P., Gomes, J.A.S., Silva, A.S., Toscano, L.T., Meireles, B.R.L.A., Cordeiro, A.M.T.M., Conceição, M.L., Souza, E.L., Aquino, J.S., 2018. Beneficial effects of consumption of acerola, cashew or guava processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. *Brit J Nutr*, 119, 30–41. <https://doi.org/10.1017/S0007114517003282>

Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem*, 239, 70–76.  
<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Carrillo, M.G., Ferrario, M., Guerrero, S., 2018. Effectiveness of UV-C light assisted by mild heat on *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 inactivation in carrot-orange juice blend studied by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Food Microbiol*, 73, 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.12.012>

Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P., 2004. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnol Progr*, 20, 248–254. <https://doi.org/10.1021/bp034165y>

Castro, H., Teixeira, P., Kirby, R., 1997. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. J Appl Microbiol, 82, 87–94.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1997.tb03301.x>

Champagne, C.P., Mondou, F., Raymond, Y., Roy, D., 1996. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. Food Res Int, 29, 555–562.

[https://doi.org/10.1016/0963-9969\(95\)00050-X](https://doi.org/10.1016/0963-9969(95)00050-X)

Champagne, C.P., Møllgaard, H., 2008. Production of Probiotic Cultures and Their Addition in Fermented Foods. In: Farnworth ER (ed), Handbook of Fermented Functional Foods, 2nd ed, CRC Press, Boca Raton, FL. US. pp. 513-532.

Champagne, C.P., Ross, R.P., Saarela, M., Hansen, K.F., Charalampopoulos, D., 2011. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. Int J Food Microbiol, 149, 185-193.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005>

Chotiko, A., Sathivel, S., 2014. Effects of enzymatically-extracted purple rice bran fiber as a protectant of *L. plantarum* NRRL B-4496 during freezing, freeze drying, and storage. LWT-Food Sci Technol, 59, 59–64.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.056>

Comas-Riu, J., Rius, N., 2009. Flow cytometry applications in the food industry. J Ind Microbiol Biot, 36, 999–1011. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0608-x>

- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M., 1992. Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*, 54, 579–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.003051>
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M., 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*, 60, 73–103. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.73>
- Dianawati, D., Mishra, V., Shah, N.P., 2013. Stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* during storage at room temperature at low  $a_w$ . *Food Res Int*, 50, 259-265. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.023>
- Duarte, F.N.D., Rodrigues, J.B., Lima, M.C., Lima, M.S., Pacheco, M.T.B., Pintado, M. M.E., Aquino, J.S., Souza, E.L., 2017. Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on *Lactobacillus* species. *J Sci of Food Agr*, 97, 3712–3719. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8232>
- Dutra, M.C.P., Rodrigues, L.L., Oliveira, D., Pereira, G.E., Lima, M.S., 2018. Integrated analyses of phenolic compounds and minerals of Brazilian organic and conventional grape juices and wines: Validation of a method for determination of Cu, Fe and Mn. *Food Chem*, 269, 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.014>
- Fonseca, F., Cenard, S., Passot, S., 2015. Freeze-drying of lactic acid bacteria. In: Wolkers W., Oldenhof H. (eds) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, v. 1257. Springer, New York, NY, pp. 477–488. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_24)

Garcia, E.F., Araújo, A.O., Luciano, W.A., Albuquerque, T.M.R., Arcanjo, N.M.O., Madruga, M.S., Lima, M.S., Magnani, M., Saarela, M., Souza, E.L., 2018. The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic *Lactobacillus* strains in apple, orange, and grape juices. *J Sci Food Agr*, 98, 5000–5010. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9034>

Golowczyc, M.A., Gerez, C.L., Silva, J., Abraham, A.G., De Antoni, G.L., Teixeira, P., 2011. Survival of spray-dried *Lactobacillus kefir* is affected by different protectants and storage conditions. *Biotechnol Lett*, 33, 681–686. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0491-6>

Gonzalez-Aguilar, G., Robles-Sanchez, R., Martinez-Tellez, M., Olivas, G., Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L., 2008. Bioactive compounds in fruits: Health benefits and effect of storage conditions. *Stewart Postharvest Rev*, 4(3), 1–10. <https://doi.org/10.2212/spr.2008.3.8>

Gonzalez-Aguilar, G., Villa-Rodriguez, J., Ayala-Zavala, J., Yahia, E., 2010. Improvement of the antioxidant status of tropical fruits as a secondary response to some postharvest treatments. *Trends Food Sci Tech*, 21, 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.004>

Gorinstein, S., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Vearasilp, S., Haruenkit, R., Ruamsuke, P., Katrich, E., Tashma, Z., 2011. Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic Thai fruits and comparison with conventional fruits. In vitro and in vivo studies. *Food Res Int*, 44(7), 2222–2232. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.009>

Grau-Campistany, A., Manresa, A., Pujol, M., Rabanal, F., Cajal, Y., 2016. Tryptophan-containing lipopeptide antibiotics derived from polymyxin B with activity against Gram positive and Gram negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1858, 333-343.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.011>

Herigstad, B., Hamilton, M., Heersink, J., 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Meth*, 44, 121–129.

[https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4)

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D.J., Pot, B., Moreli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11, 506-514.

<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

Hubalek, Z., 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46, 205–229. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)

Infante, J., Selani, M.M., Toledo, N.M.V., Silveira-Diniz, M.F., Alencar, S.M., Spoto, M.H.F., 2013. Antioxidant activity of agroindustrial residues from tropical fruits. *Braz J Food Nutr*, 24, 87–91.



Kim, D.K., Kim, S.J., Kang, D.H., 2017. Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts. *Food Res Int*, 97, 280–287.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.009>

Léonard, L., Chibane, L.B., Bouhedda, B.O., Degraeve, P., Oulahal, N., 2016. Recent advances on multi-parameter flow cytometry to characterize antimicrobial treatments. *Front in Microbiol*, 7, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01225>

Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H., Crowe, L.M., 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol*, 61, 3592–3597.

Li, B., Tian, F., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., 2011. Effects of cryoprotectants on viability of *Lactobacillus reuteri* CICC6226. *Appl Microbiol Biot*, 92(3), 609–616.

<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3269-4>

Liu, M., Li, X.Q., Weber, C., Lee, C.Y., Brown, J., Liu, R.H., 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J Agr and Food Chem*, 50, 2926–2930.

<https://doi.org/10.1021/jf0111209>

Moayyedia, M., Eskandarib, M.H., Rada, A.H.E., Ziaeeb, E., Khodaparastc, M.H.H., Golmakanib, M., 2018. Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *J Funct Foods*, 40, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.016>

Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., Vesey, G., 2006. Preservation of microorganisms by drying: a review. *J Microbiol Meth*, 66(2), 183–193.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>

Nóbrega, E.M., Oliveira, E.L., Genovese, M.I., Correia, R.T.P., 2015. The Impact of Hot Air Drying on the Physical-Chemical Characteristics, Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Acerola (*Malphigia emarginata*) Residue. *J Food Process Pres*, 39, 131–141.

<https://doi.org/10.1111/jfpp.12213>

Nunes, G.L., Etchepare, M.A., Cichoski, A.J., Zepka, L.Q., Lopes, E.J., Barin, J.S., Flores, E.M.M., Silva, C.B., Menezes, C. R., 2018. Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. *LWT-Food Sci Technol*, 89, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.032>

Padilha, C.V.S., Miskinis, G.A., Souza, M.E.A.O., Pereira, G.E., Oliveira, D., Bordignon-Luiz, M.T., Lima, M.S., 2017. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chem*, 228, 106–115.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.137>

Ragoonanan, V., Hubel, A., Aksan, A., 2010. Response of the cell membrane-cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses. *Cryobiology*, 61, 335–344.

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.10.160>

Reid, A.A., Champagne, C.P., Gardner, N., Fustier, P., Vuillemand, J.C., 2007. Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. J Food Sci, 72, M31–M37. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00222.x>

Rockenbach, I.I., Rodrigues, E., Gonzaga, L.V., Caliari, V., Genovese, M.I., Gonçalves, A.E.S.S., Fett, R., 2011. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*vitis vinifera* L. and *vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. Food Chem, 127, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.137>

Romano, N., Tymczyszyn, E., Mobili, A., Gómez-Zavaglia, A., 2015. Prebiotics as protectants of lactic acid bacteria. In W. RR, & P. VR (Eds.), Bioactive foods in promoting health: Probiotics, prebiotics, and synbiotics (2nd ed.). Part 1: Prebiotics in health promotion. Academic Press, Elsevier. pp. 155–164.  
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.10.055>

Romano, N., Schebor, C., Mobili, P., Gómez-Zavaglia, A., 2016. Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Food Res Int, 90, 251–258.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.003>

Sancho, S.O., Silva, A.R.A., Dantas, A.N.S., Magalhães, T.A., Lopes, G.S., Rodrigues, S., Costa, J.M.C., Fernandes, F.A.N., Silva, M. G. V., 2015. Characterization of the Industrial Residues of Seven Fruits and Prospection of Their Potential Application as Food Supplements. J Chem, 2015, 1–8. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/264284>

Santivarangkna, C., Higl, B., Foerst, P., 2008. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. Food Microbiol, 25, 429–441. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2007.12.004>

Santos, M.I., Araujo-Andrade, C., Tymczyszyn, E.E., Gómez-Zavaglia, A., 2014a. Determination of amorphous/rubbery states in freeze-dried prebiotic sugars using a combined approach of near-infrared spectroscopy and multivariate analysis. Food Res Int, 64, 514-519. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.040>

Santos, M.I., Gerbino, E., Araujo-Andrade, C., Tymczyszyn, E., Gomez-Zavaglia, A., 2014b. Stability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in the presence of galacto-oligosaccharides and lactulose as determined by near infrared spectroscopy. Food Res Int, 59, 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.054>

Sariburun, E., Sahin, S., Demir, C., Turkben, C., Uylaser, V., 2010. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry cultivars. J Food Sci, 75, 328–335. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01571.x>

Silva, F., Ferreira, S., Queiroz, J.A., Domingues, F.C., 2011. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. J Med Microbiol, 60, 1479–1486. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.034157-0>

Silva, L.M.R., Figueiredo, E.A.T., Ricardo, N.M.P.S., Vieira, I.G.P., Figueiredo, R.W., Brasil, I.M., Gomes, C.L., 2014. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chem*, 143, 398–404.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.001>

Sosa, N., Gerbino, E., Golowczyc, M., Schebor, C., Gómez-Zavaglia, A., Tymczyszyn, E.E., 2016. Effect of galacto-oligosaccharides: maltodextrin matrices on the recovery of *Lactobacillus plantarum* after spray-drying. *Front Microbiol*, 7, 584, 2016.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00584>

Sousa, M.S.B., Vieira, L.M., 2011. Total phenolics and in vitro antioxidant capacity of tropical fruit pulp wastes. *Braz J Food Technol*, 14, 202–210.

<http://dx.doi.org/10.4260/BJFT2011140300024>

Sousa, S., Pinto, J., Pereira, C., Malcata, F.X., Pacheco, M.T.B., Gomes, A.M., Pintado, M., 2015. *In vitro* evaluation of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour prebiotic potential. *Food Bioprod Process*, 95, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.04.003>

Sun, X., Gao, L., Wang, S., Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, B., 2013. Use of betagalactosidase liposome model as a novel method to screen freeze-drying cryoprotectants. *World J Microbiol Biotechnol*, 29, 1907–1912.

<https://doi.org/10.1007/s11274-013-1355-8>

Sun, Z., Harris, H.M.B., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., Yang, X., Jeffery, Y.B., Cooney, J.C., Kagawa, T.F., Liu, W., Song, Y., Salvetti, E., Wrobel, A., Rasinkangas,

P., Parkhill, J., Rea, M.C., O'Sullivan, O., Ritari, J., Douillard, F.P., Ross, R.P., Yang, R., Briner, A.E., Felis, G.E., Vos, W.M., Barrangou, R., Klaenhammer, T.R., Caufield, P.W., Cui, Y., Zhang, H., O'Toole, P. W., 2015. Expanding the biotechnology potential of *Lactobacilli* through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat Commun*, 6, 1–13.

<https://doi.org/10.1038/ncomms9322>

Tracy, B.P., Gaida, S.M., Papoutsakis, E.T., 2010. Flow cytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes. *Curr Opin Biotech*, 21, 85–99.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.006>

Tripathi, M.K., Giri, S.K., 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J Funct Foods*, 9, 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>

Tymczyszyn, E.E., Díaz, M.R., Gómez-Zavaglia, A., Disalvo, E.A., 2007. Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *J Appl Microbiol*, 103, 2410–2419.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03482.x>

Tymczyszyn, E.E., Díaz, M.R., Pataro, A., Sandonato, N., Gómez-Zavaglia, A., Disalvo, E.A., 2008. Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. *Int J Food Microbiol*, 128, 342–347.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.009>

Tymczyszyn, E.E., Gerbino, E., Illanes, A., Gomez-Zavaglia, A., 2011. Galacto-oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Cryobiology*, 62, 123–129.

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.01.013>

Tymczyszyn, E.E., Sosa, N., Gerbino, E., Gomez-Zavaglia, A., Schebor, C., 2012. Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *Int J Food Microbiol*, 155, 217–221.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.008>

Velly, H., Bouix, M., Passot, S., Penicaud, C., Beinstainer, H., Ghorbal, S., Lieben, P., Fonseca, F., 2015. Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-drying resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161. *Appl Microbiol Biot*, 99, 907-918.

<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6152-2>

Wolkers, W.F., Balasubramanian, S.K., Ongstad, E.L., Zec, H.C., Bischof, J.C., 2007. Effects of freezing on membranes and proteins in LNCaP prostate tumor cells. *Biochim Biophys Acta*, 1768, 728–736. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.12.007>

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64, 555–559.

[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

**Figure 1** - Viable cell counts (log CFU mL<sup>-1</sup>) of (A) *L. paracasei* L-10, (B) *L. casei* L-26 and (C) *L. acidophilus* LA-05 freeze-dried in the absence (CNE, ●) and presence of fructo-oligosaccharides (FOS, ■) or of acerola (ACE, □), cashew (CAS, △) and guava (GUA, ○) processing co-products during 48 h of incubation at 37 °C.

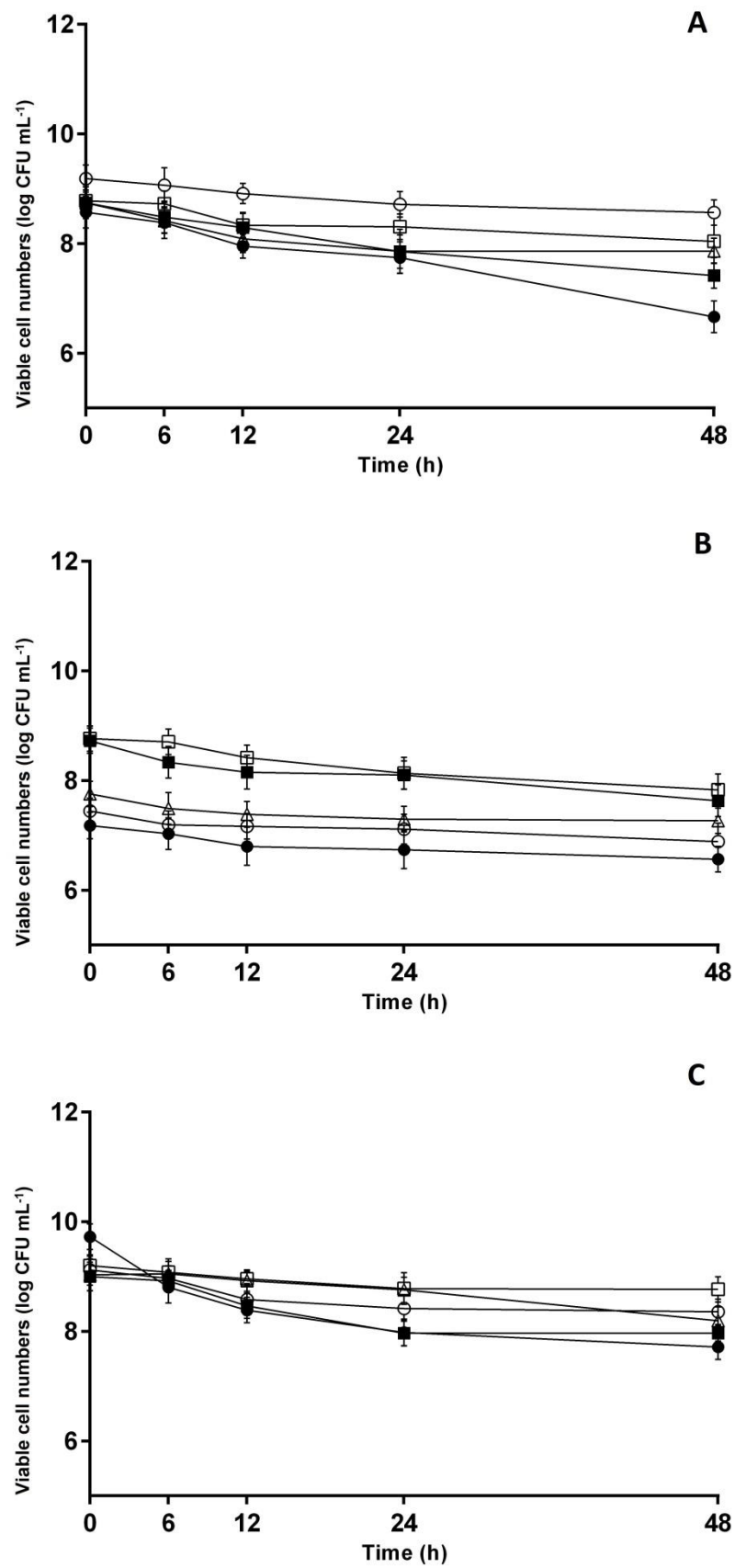
**Figure 2** - Fluorescence density plot of *L. paracasei* L-10 in response to staining with PI (A-E), EB (F-J) and DiBAC<sub>4</sub>(3) (K-O) after freeze-drying in the absence (CNE, ●) and presence of fructo-oligosaccharides (FOS, ■) or of acerola (ACE, □), cashew (CAS, △) and guava (GUA, ○) processing co-products.

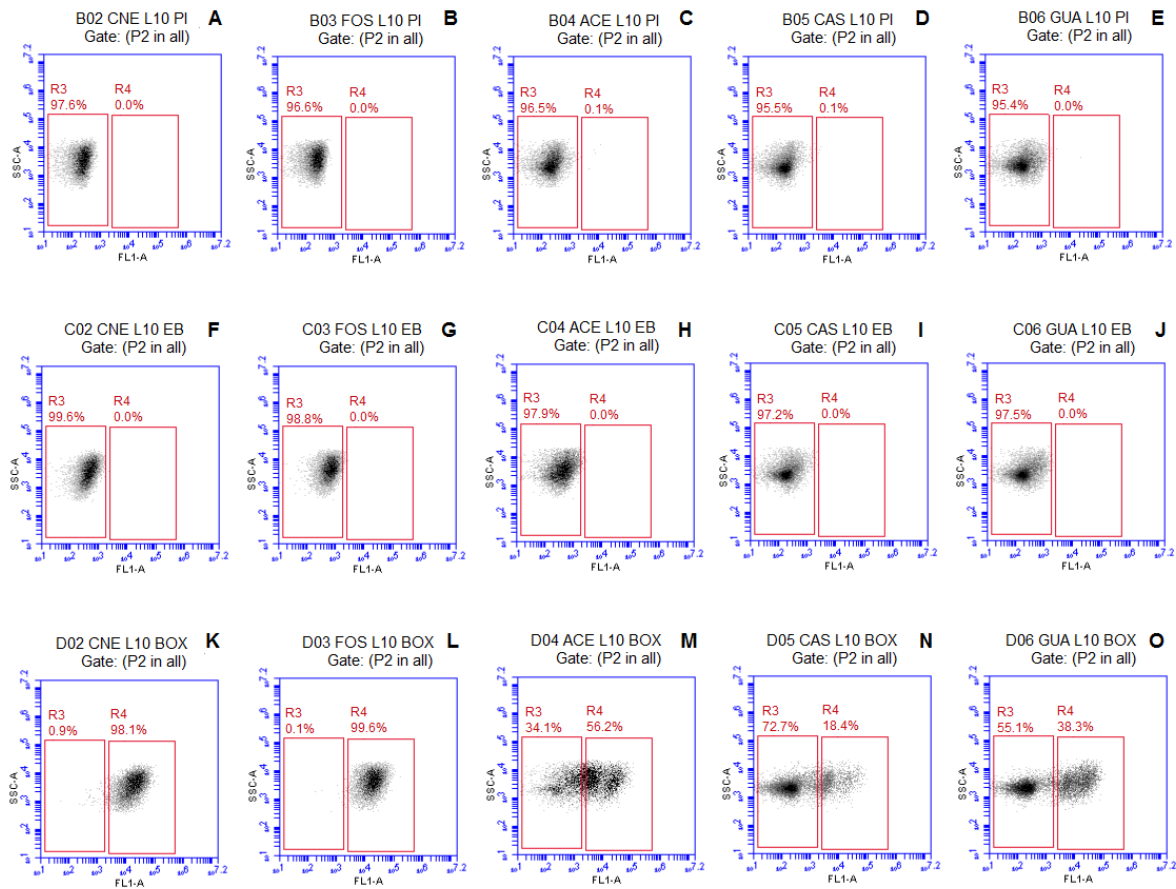
**Figure 3** - Fluorescence density plot of *L. casei* L-26 in response to staining with PI (A-E), EB (F-J) and DiBAC<sub>4</sub>(3) (K-O) after freeze-drying in the absence (CNE, ●) and presence of fructo-oligosaccharides (FOS, ■) or of acerola (ACE, □), cashew (CAS, △) and guava (GUA, ○) processing co-products.

**Figure 4** - Fluorescence density plot of *L. acidophilus* LA-05 in response to staining with PI (A-E), EB (F-J) and DiBAC<sub>4</sub>(3) (K-O) after freeze-drying in the absence (CNE, ●) and presence of fructo-oligosaccharides (FOS, ■) or of acerola (ACE, □), cashew (CAS, △) and guava (GUA, ○) processing co-products.

**Figure 5** - Viable cell counts (log CFU mL<sup>-1</sup>) of (A) *L. paracasei* L-10, (B) *L. casei* L-26 and (C) *L. acidophilus* LA-05 freeze-dried in the absence (CNE, ●) and presence of fructo-oligosaccharides (FOS, ■) or of acerola (ACE, □), cashew (CAS, △) and guava (GUA, ○) processing co-products during 90 days of storage at 4 ± 0.5 °C (A, C and E) and 25 ± 0.5 °C (B, D and F).

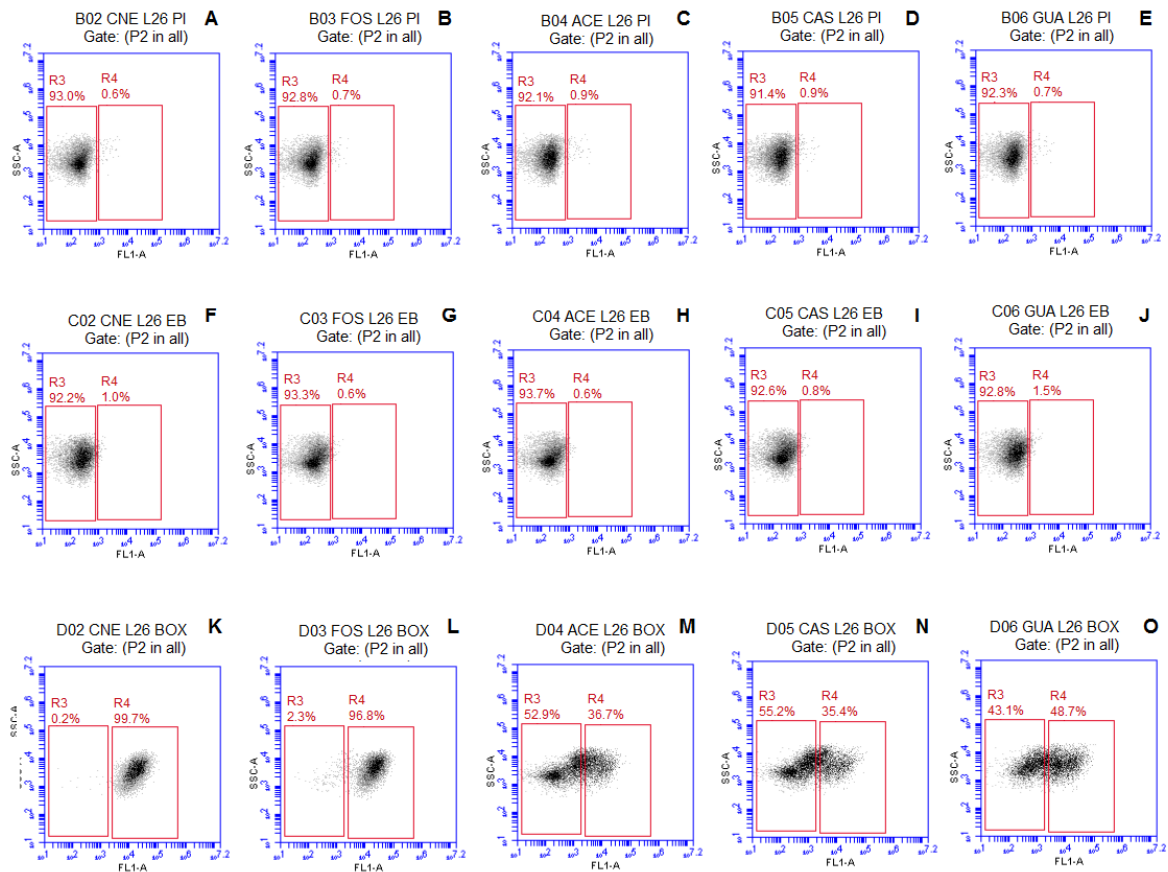


**Fig. 1**



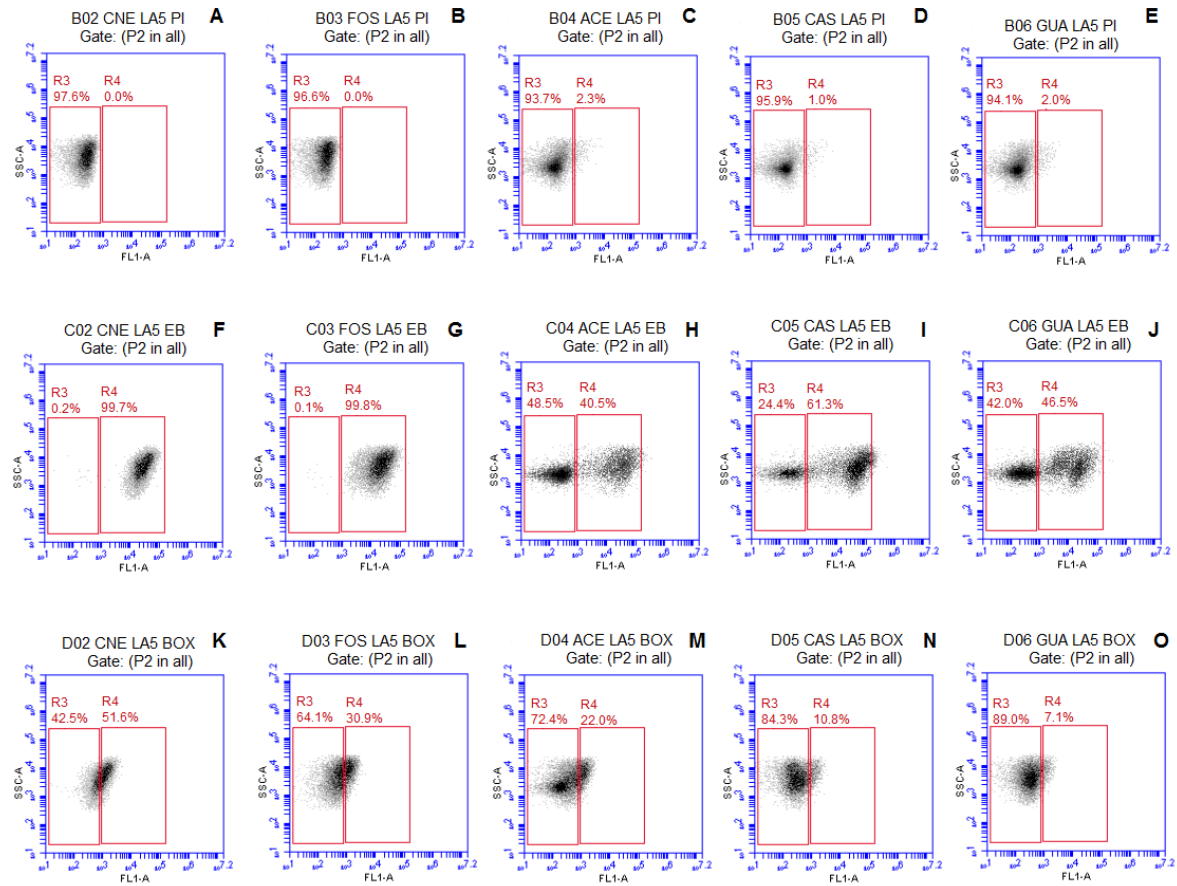
L10 - *L. paracasei* L-10. The vertical axis indicates the fluorescence intensity of PI (propidium iodide), EB (ethidium bromide) and DiBAC4 (3) (biz-1,3-dibutylbarbutaric acid) and the intensity of lateral light dispersal. The subpopulation of negative stains was blocked in the left rectangles; the positive subpopulation of the stains was delimited in the right rectangles. The percentages of cell populations that fell on each port are shown in each plot.

**Fig. 2**



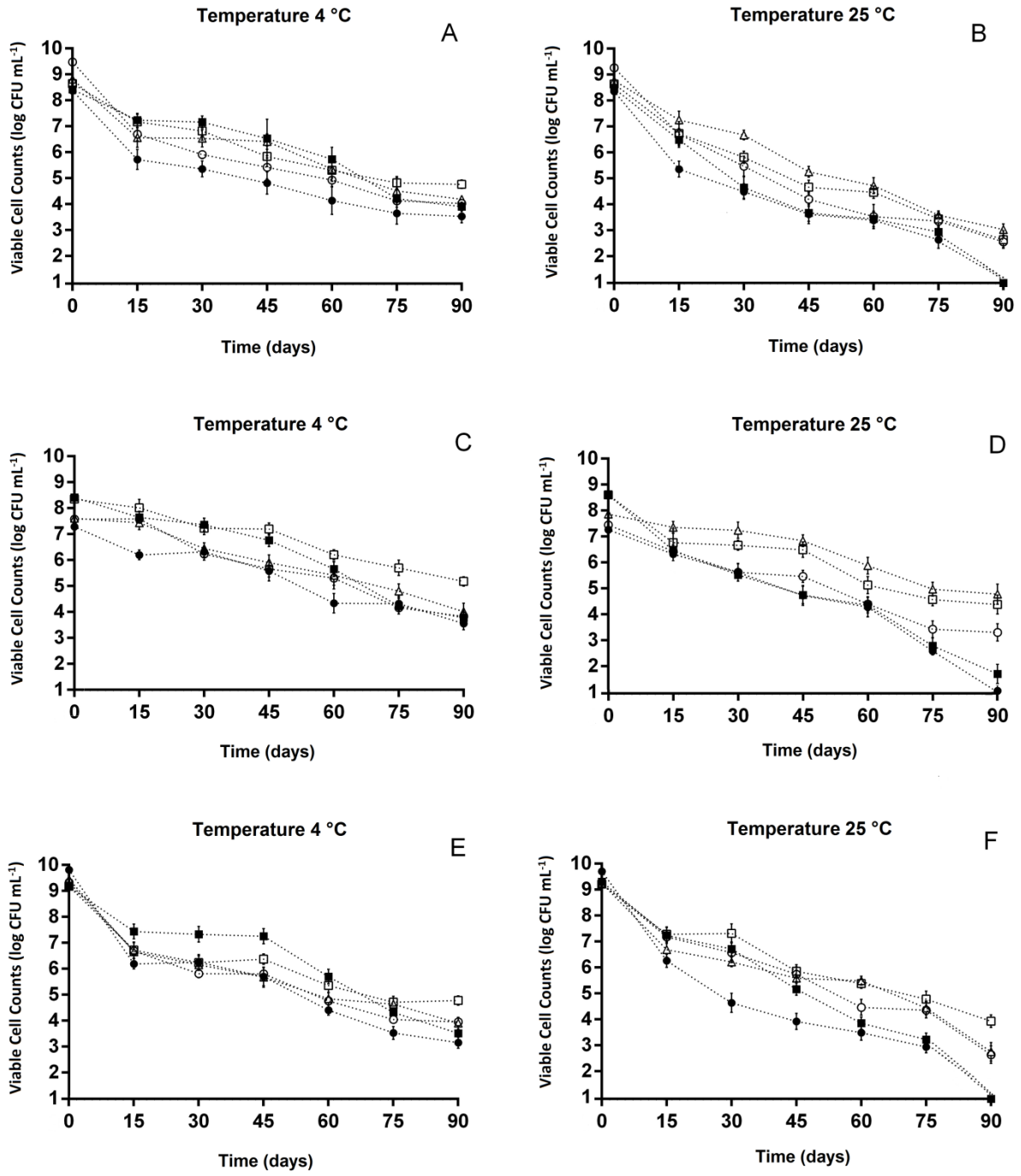
L26 - *L. casei* L-26. The vertical axis indicates the fluorescence intensity of PI (propidium iodide), EB (ethidium bromide) and DiBAC4 (3) (biz-1,3-dibutylbarbaturic acid) and the intensity of lateral light dispersal. The subpopulation of negative stains was blocked in the left rectangles; the positive subpopulation of the stains was delimited in the right rectangles. The percentages of cell populations that fell on each port are shown in each plot.

**Fig. 3**



LA-05 - *L. acidophilus* LA-05. The vertical axis indicates the fluorescence intensity of PI (propidium iodide), EB (ethidium bromide) and DiBAC4 (3) (biz-1,3-dibutylbarbaturic acid) and the intensity of lateral light dispersal. The subpopulation of negative stains was blocked in the left rectangles; the positive subpopulation of the stains was delimited in the right rectangles. The percentages of cell populations that fell on each port are shown in each plot.

**Fig. 4**



**Fig. 5**

**Table 1**

Physical-chemical characterization (mean  $\pm$  SD) of the freeze-dried co-products used in assays of protective effect on probiotic *Lactobacillus* strains.

Parameters	Co-products		
	ACEROLA	CASHEW	GUAVA
Simple sugars (g/100 g)			
Fructose	8.48 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	4.80 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	3.92 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
Glucose	5.31 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	4.88 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	3.17 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
Maltose	1.52 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.97 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.53 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Phenolic compounds (mg/100 g)			
Flavanol			
Catechin	3.12 $\pm$ 0.00	ND	1.95 $\pm$ 0.02
Flavanone			
Hesperetin	1.43 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.25 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	1.61 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
Naringenin	1.37 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.31 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
Flavonol			
Kaempferol	1.18 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.81 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
Myricetin	0.49 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	2.71 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.84 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
Quercetin	4.16 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.91 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.89 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
Rutin	1.19 $\pm$ 0.01	0.97 $\pm$ 0.02	ND
Hydroxybenzoic acids			
Syringic acid	ND	0.91 $\pm$ 0.07	0.52 $\pm$ 0.03
Hydroxycinnamic acids			
Caffeic acid	0.56 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.55 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.21 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
p-Coumaric acid	0.39 $\pm$ 0.01	ND	ND
Caftaric acid	0.92 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.32 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.64 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
Chlorogenic acid	0.35 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.31 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.62 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
Polifénols			
Trans-resveratrol	1.12 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.32 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
Cis-Resveratrol	1.51 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.91 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
Epicatechin gallate	0.37 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.71 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.22 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
Epicatechin	ND	1.04 $\pm$ 0.05	1.25 $\pm$ 0.05
Anthocyanins			
Petunidin 3-glucoside	0.49 $\pm$ 0.01	1.25 $\pm$ 0.05	ND
Pelargonidin 3-glucoside	ND	1.11 $\pm$ 0.01	ND
Procyanidin B1	ND	0.62 $\pm$ 0.04	0.51 $\pm$ 0.01
Procyanidin B2	ND	1.69 $\pm$ 0.09	0.43 $\pm$ 0.01
Procyanidin A2	ND	1.05 $\pm$ 0.01	1.13 $\pm$ 0.01
Total flavonoids (mg EC/100 g) <sup>1</sup>	79.83 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	44.49 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>	44.09 $\pm$ 1.01 <sup>b</sup>
Total phenolic (mg EAG/100g) <sup>2</sup>	492.107 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	368.520 $\pm$ 1.09 <sup>b</sup>	304.057 $\pm$ 0.94 <sup>c</sup>
FRAP ( $\mu$ mol trolox TEAC/g) <sup>3</sup>	0.92 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.88 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.74 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
ABTS ( $\mu$ mol trolox TEAC/g) <sup>3</sup>	16.14 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	15.29 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	14.54 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> Mean  $\pm$  standard deviation with different lowercase letters on the same line differed by the Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ) among co-products.

ND - not detected.

<sup>1</sup> The results were expressed in mg equivalents of catechin (EC) per hundred grams of sample (mg EC/100 g). <sup>2</sup> The results were expressed in mg equivalents of gallic acid (EAG) per hundred grams of sample (mg EAG/100 g). <sup>3</sup> The results were expressed as  $\mu\text{mol}$  trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) per gram of sample ( $\mu\text{mol}$  trolox TEAC/g).